

Diferencijacija stanica trofoblasta u normalnoj i patološkoj trudnoći

Zmijanac Partl, Jasenka

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:278538>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**EUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Jasenska Zmijanac Partl

**Diferencijacija stanica trofoblasta u
normalnoj i patološkoj trudnoći**

DISERTACIJA



Zagreb, 2016.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Jasenska Zmijanac Partl

**Diferencijacija stanica trofoblasta u
normalnoj i patološkoj trudnoći**

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

Disertacija je izrađena u Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Klinici za ženske bolesti i porode KB Merkur, Zagreb

Voditelj rada: prof. dr. sc. Ljiljana Šerman

Posebno se zahvaljujem mojoj mentorici, prof. dr. sc. Ljiljani Šerman na neiscrpnom strpljenju, podršci, razumijevanju i nesebično darovanom znanju te uputama i savjetima bez kojih ovaj rad ne bih privela kraju.

Veliko hvala predstojnici Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu, prof. dr. sc. Florijani Bulić Jakuš na velikodušnoj spremnosti za materijalnu pomoć u svim fazama obrade uzoraka.

Zahvaljujem se svim suradnicima Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu za cjelokupnu pomoć u radu a osobito doc. dr. sc. Tamari Nikuševoj Martić te ing. Marijani Druga, Ivani Jurković i Ivi Geček na tehničkoj pomoći.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr. sc. Vesni Crnek Kunstelj koja je svojom ljubaznošću i razumijevanjem potaknula i podržala ovu uspješnu suradnju.

Zahvaljujem kolegi i prijatelju doc. dr. sc. Željku Duiću na korisnim savjetima, poticanju i svakodnevnoj podršci u radu.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Aniti Škrtić na darovanom vremenu, znanju i trudu za patohistološku obradu prikupljenih uzoraka posteljica.

Najljepša hvala specijalizantima ginekologije i primaljama rađaonice KB Merkur za pomoć prilikom prikupljanja uzoraka posteljica.

Osobito se zahvaljujem roditeljima koje su donirale posteljice za moje istraživanje.

Hvala i mojem suprugu i sinu koji su se trudili pomoći na bilo koji način.

Ovaj rad posvećujem svojoj majci, koja me nesebično podržavala i vjerovala u mene svih ovih godina, hrabrila me i poticala te me uvijek iznova osnažila svojom neizmjernom ljubavi kako to samo majka može.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1. Razvoj posteljice	3
1.1.1. Diferencijacija trofoblasta	
1.1.2. Implantacija	3
1.1.3. Dva vala invazije trofoblasta	4
1.1.4. Razvoj korionskih resica	6
1.2. Molekularna osnova diferencijacije i invazije humanog ekstraviloznog trofoblasta – pregled literature	8
1.2.1. Wnt signalni put	11
1.2.1.1. Sudionici Wnt signalnog puta	11
1.2.1.2. Kanonski put djelovanja Wnt signalnog puta	15
1.2.1.3. Nekanonski putevi djelovanja Wnt signalnog puta	16
1.2.1.4. Wnt signalni put u tkivu posteljice	17
1.3. Epitelno - mezenhimna tranzicija (EMT)	19
1.3.1. EMT i Snail	21
1.4. Wnt signalni put i EMT u bolestima vezanim uz trudnoću	21
1.4.1. Zastoj rasta	22
1.4.2. Gestacijska hipertenzija, preeklampsija, eklampsija, HELLP	24
2. HIPOTEZA	26
3. CILJEVI RADA	27
4. MATERIJAL I METODE	28
4.1. Materijal	28
4.2. Metode	30
4.2.1. Uzorkovanje posteljica	30
4.2.2. Imunohistokemijska analiza	30
4.2.2.1. Priprema za imunohistokemiju	30
4.2.2.2. Imunohistokemijska obrada posteljica	31
4.2.3. Imunofluorescencija	31
4.2.4. Stereološka kvantitativna analiza	32
4.2.5. Statističke metode	33

5. REZULTATI	34
5.1. Ekspresija proteina SFRP1	34
5.1.1. Ekspresija proteina SFRP1 u patološkim terminskim i patološkim prijevremeno porođenim posteljicama	37
5.1.2. Ekspresija proteina SFRP1 u posteljicama kod prijevremenih poroda bez pridružene patologije (kontrolne prijevremene posteljice)	40
5.1.3. Ekspresija proteina SFRP1 u posteljicama kod terminskog idiopatskog zastoja u rastu ploda (IUGR)	44
5.1.4. . Ekspresija proteina SFRP1 u posteljicama kod prijevremeno porođenog idiopatskog zastoja u rastu ploda (IUGR)	47
5.1.5. . Ekspresija proteina SFRP1 u terminskim posteljicama kod zastoja u rastu ploda uz povišeni krvni tlak majke	52
5.1.6. Ekspresija proteina SFRP1 u posteljicama kod prijevremenog poroda uz zastoj u rastu ploda i povišeni krvni tlak majke	55
5.1.7. Ekspresija proteina SFRP1 u terminskim posteljicama kod povišenog krvnog tlaka majke bez zastoja u rastu ploda (djeca eutrofična za dob, spol i paritet majke)	61
5.1.8. Ekspresija proteina SFRP1 u prijevremeno porođenim posteljicama kod povišenog krvnog tlaka majke bez zastoja u rastu ploda (djeca eutrofična za gestacijsku dob, spol i paritet majke)	65
5.1.9. Ekspresija proteina SFRP1 u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća kompliciranih s gestacijskim dijabetesom	70
5.1.10. Ekspresija proteina SFRP1 u terminskim posteljicama iz trudnoća s povišenim krvnim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom	75
5.1.11. Ekspresija proteina SFRP1 u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim krvnim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom	78
5.1.12. Ekspresija proteina SFRP1 u terminskim posteljicama kod zastoja u rastu ploda uz gestacijsku šećernu bolest	83
5.1.13. Ekspresija proteina SFRP1 u posteljicama kod anomalija ploda	85
5.1.14. Usporedba ekspresije proteina SFRP1 u terminskim patološkim posteljicama s terminskim i prijevremenim kontrolama	88
5.1.15. Usporedba ekspresije proteina SFRP1 u prijevremeno porođenim patološkim posteljicama s terminskim i prijevremenim kontrolama	91

5.2. Ekspresija proteina SFRP3	97
5.2.1. Ekspresija proteina SFRP3 u patološkim terminskim i patološkim prijevremeno porođenim posteljicama	98
5.2.2. Ekspresija proteina SFRP3 u posteljicama kod prijevremenih poroda bez pridružene patologije (kontrolne prijevremeno porođene posteljice)	101
5.2.3. Ekspresija proteina SFRP3 u posteljicama kod terminskog idiopatskog IUGR-a	103
5.2.4. Ekspresija proteina SFRP3 u posteljicama kod prijevremeno porođenog idiopatskog IUGR-a	105
5.2.5. Ekspresija proteina SFRP3 u posteljicama kod prijevremenog poroda uz IUGR i povišeni krvni tlak majke	107
5.2.6. Ekspresija proteina SFRP3 u terminskim posteljicama kod povišenog krvnog tlaka uz eutrofičnu djecu	109
5.2.7. Ekspresija proteina SFRP3 u prijevremeno porođenim posteljicama kod povišenog krvnog tlaka uz djecu eutrofičnu za gestacijsku dob, spol i paritet majke	111
5.2.8. Ekspresija proteina SFRP3 u prijevremeno porođenim posteljicama s gestacijskom šećernom bolesti	113
5.2.9. Ekspresija proteina SFRP3 u terminskim posteljicama iz trudnoća s povišenim krvnim tlakom i gestacijskim dijabetesom	115
5.2.10. Ekspresija proteina SFRP3 u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim krvnim tlakom i gestacijskim dijabetesom	117
5.2.11. Ekspresija proteina SFRP3 u posteljicama kod anomalija ploda	119
5.2.12. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u terminskim patološkim posteljicama s terminskim i prijevremenim kontrolama	121
5.2.13. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u prijevremeno porođenim patološkim posteljicama s terminskim i prijevremenim kontrolama	124
5.3. Ekspresija proteina TCF1	129
5.4. Ekspresija proteina ELF5	136
5.4.1. Ekspresija proteina ELF5 u patološkim terminskim i patološkim prijevremeno porođenim posteljicama	137
5.4.2. Ekspresija proteina ELF5 u posteljicama kod prijevremenog poroda bez pridružene patologije (kontrolne prijevremeno porođene posteljice)	139

5.4.3. Ekspresija proteina ELF5 u posteljicama kod terminskog idiopatskog IUGR-a	140
5.4.4. Ekspresija proteina ELF5 u prijevremeno porođenim posteljicama uz IUGR i povišeni krvni tlak majke	142
5.4.5. Ekspresija proteina ELF5 u prijevremeno porođenim posteljicama kod povišenog krvnog tlaka majke i eutrofične djece	144
5.4.6. Ekspresija proteina ELF5 u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom i gestacijskim dijabetesom	146
5.4.7. Međusobna usporedba ekspresije proteina ELF5 u posteljicama iz patoloških trudnoća te usporedba s terminskim i prijevremenim kontrolama	148
6. RASPRAVA	150
6.1. SFRP1 I SFRP3	151
6.1.1. Prijevemeni porodi	151
6.1.2. Trudnoće sa zastojem u rastu ploda	152
6.1.3. Trudnoće s hipertenzivnim poremećajem	153
6.1.4. Gestacijski dijabetes	155
6.1.5. Međusobna usporedba analiziranih skupina posteljica	156
6.1.5.1. Patološke terminske posteljice	156
6.1.5.2. Patološke prijevremeno porođene posteljice	157
6.1.6. Kako objasniti ovakve rezultate?	158
6.2. TCF1	166
6.3. ELF5	169
7. ZAKLJUČCI	173
8. SAŽETAK	174
9. SUMMARY	175
10. POPIS LITERATURE	176
11. BIOGRAFIJA	196

POPIS OZNAKA I KRATICA

AJ	Adherentni spojevi (engl. adherens junctions)
AKT	Protein kinaza B (PKB); serin/treonin specifična protein kinaza
APC	Protein adenomatozne polipoze kolona, (engl. Adenomatous polyposis coli protein)
bHLH	Transkripcijski protein s motivom uzvojnica-petlja-uzvojnica (engl. Basic helix-loop-helix protein)
β trCP	Protein koji sadrži ponavljanje beta transducina (engl. Beta-transducin repeat containing protein)
BMI	Indeks tjelesne mase (engl. Body mass index)
CamK II	O kalciju/kalmodulinu ovisna kinaza II (engl. Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II)
Cdx2	Homeotički transkripcijski factor (engl. Caudal-type homeodomain)
cGMP	Ciklički guanozin monofosfat
CK-1 α	Kazein kinaza 1 alfa
CMV	Citomegalovirus
CRIPTO-1	Član obitelji epidermalnog faktora rasta koji imaju specifičnu kripto domenu
CTB	Citotrofoblast
<i>CTTNB-1</i>	Gen koji kodira za beta katenin
Daam1	Aktivator morfogeneze povezan s Dishevelled proteinom (engl. Dishevelled associated activator of morphogenesis 1)
DAB	3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid
Dkk	Protein <i>Dickkopf</i>
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
Dvl	Protein <i>Dishevelled</i>
ECM	Izvanstanični matriks (engl. Extracellular matrix)
EGF	Epidermalni faktor rasta (engl. Epidermal growth factor)
EGFR1	Receptor za epidermalni faktor rasta 1 (engl. Epidermal growth factor receptor)
ELF5	Transkripcijski faktor ELF5 (engl. E74-like factor 5)
EMT	Epitelno - mezenhimna tranzicija
<i>Eomes</i>	Gen za T-box transkripcijski faktor <i>Eomesodermin</i>
F/P omjer	Fetoplacentalni omjer

ERK	Izvanstanično regulirane kinaze
ESRRb	Transkripcijski faktor povezan s estrogenim receptorom (engl. estrogen- related receptor beta)
ETS	Transkripcijski factor ETS (engl.E- twenty six transcription factor)
EVT	Ekstravilozni trofoblast
FAP	Obiteljska adenomatozna polipoza (engl. Familial adenomatous polyposis)
<i>FN 1</i>	Gen za fibronektin 1
FSP1	Protein specifičan za fibroblast (engl. Fibroblast specific protein 1)
GATA 3	Protein 3 koji se veže na GATA ponavljanja (engl. GATA binding protein 3)
GBP	Protein koji se veže na glikogen sintetazu kinazu 3 beta (engl. GSK-3 binding protein)
GCM1	Transkripcijski protein GCM1 (engl.Glial cells missing 1)
GSK3β	Glikogen sintetaza kinaza 3 beta
HAPO	engl. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcome study
hCG	Humani korionski gonadotropin
HELLP Sy	Sindrom HELLP (engl. Haemolysis, elevated liver enzymes, low platelets syndrome)
HGF	Faktor rasta hepatocita (engl. Hepatocyte growth factor)
HIF1α	Faktor koji inducira hipoksiju (engl. Hypoxia inducible factor alpha)
HLA	Humani leukocitni antigen (engl. Human leucocyte antigen)
HMG	Transkripcijski faktor s HMG (engl. High mobility group)
ICM	Embrioblast (engl. Inner cell mass, embryoblast)
Id2	Transkripcijski faktor Id2 (engl. Inhibitor of DNA binding 2)
IGF	Inzulinu nalik faktor rasta (engl. Insulin-like growth factor)
<i>Int-1</i>	Gen za integraciju virusa tumora dojke u glodavaca
<i>ITGA</i>	Gen za integrin alfa
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza
LDH	Laktat dehidrogenaza
LEF	Transkripcijski faktor LEF (engl.Lymphoid enhancer factor)
LRP	Protein pridružen lipoproteinu niske gustoće (engl. Low density lipoprotein receptor related protein)
MAPK	Protein kinaza aktivirana mitogenom (engl. Mitogen activated protein kinase)
MET	Mezenhimno - epitelna tranzicija

MMP	Matriks metaloproteinaze
mTOR	Signalni put mTOR (engl. Mammalian target of rapamycin)
NEMO	Transkripcijski faktor NEMO (engl. Nuclear factor essential modulator)
NF-AT	Transkripcijski faktor NF-AT (engl. Nuclear factor of activated T cells)
NK stanice	Stanice prirodni ubojice (engl. Natural killer cells)
Oct4	Transkripcijski faktor Oct4 (engl. Octamer-binding transcription factor 4)
OGTT	Oralni test opterećenja glukozom (engl. Oral glucosae tolerance test)
PAI	Inhibitor aktivatora plazminogena
PAR-1	Receptor PAR-1 (engl. Protease – activated receptor 1)
PCP	Proces polariteta stanica (engl. Planar cell polarity)
PDZ domene	Zajednička struktura od 80-90 aminokiselina u proteinima PSD-95, Dlg i ZO-1
PI3K	Phosphatidilinozitol 3 kinaza (engl. Phosphoinozitol 3 kinase)
PKC	Protein kinaza C
PKG	Protein kinaza ovisna o cGMP (engl. cGMP- dependent protein kinase)
rac1	engl. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RGS	Regulator signalizacije G proteina (engl. Regulator of G protein signalling)
Rho	Član proteinske obitelji Rho (engl. Ras homologue gene family member)
RNA	Ribonukleninska kiselina
Rock	Protein kinaza Rock (engl. Rho-associated coiled-coil containing protein kinase)
Ror	Receptor nalik tirozin kinazi (engl. Tyrosin kinase–like orphan receptor)
RT-PCR	Lančana reakcija polimeraze (engl. Real- time polymerase chain reaction)
Ryk	Tirozin kinaza vezana uz receptor (engl. Related-to-receptor tyrosin kinase)
Ser	Aminokiselina Serin
SFRP	Protein povezan s Frizzled receptorom (engl. Secreted Frizzled- related protein)
SGA	Malen za gestacijsku dob (engl. Small for gestational age)
Snail 2	Protein s motivom cinkovih prstiju Snail 2 (engl. Zinc finger protein Snail)
STAT3	Transkripcijski faktor STAT3 (engl. Signal transducer and activator of transcription 3)
<i>STOX1</i>	Gen za transkripcijski faktor STOX1 (engl. Storkhead box 1)
TAK-1	TGFβ–om aktivirana kinaza
TCF	Transkripcijski faktor TCF (engl. T-cell specific transcription factor)

Tcfap2C	Mišji homolog humanom transkripcijskom faktoru koji aktivira protein 2C (TFAP2C) (engl. Transcription factor activator protein 2C)
TEAD4	Transkripcijski faktor 4 s TEA domenom
TGC	Gigantske stanice trofoblasta (engl. Trophoblast giant cells)
TGFβ3	Transformirajući faktor rasta beta 3 (engl. Transforming growth factor beta 3)
Thr	Aminokiselina treonin
TIMP	Tkivni inhibitori metaloproteinaza
TNF	Faktor nekroze tumora (engl. Tumor necrosis factor)
TORCH	Toksoplazma, rubela, citomegalovirus, herpes virus
uPA	Urokinazni aktivator plazminogena (engl. Urokinase plasminogen activator)
uPAR	Receptor urokinaznog aktivatora plazminogena
vCTB	Vilozni citotrofoblast
VEGF	Vaskularni endotelni faktor rasta (engl. Vascular endothelial growth factor)
Wif-1	Inhibitor signalnog puta Wnt (engl. Wnt-inhibitory factor 1)
Wise	Secernirajući protein Wise (engl. Wnt modulator in surface ectoderm)
<i>WNT</i>	Gen za Wnt protein (engl. Wingless gen + int1 gen)
ZO-1	Protein stanične adhezije ZO-1 (engl. Zona occludens protein 1)

1. UVOD I SVRHA RADA

Posteljica je jedinstveni organ koji služi kao mjesto razmjene plinova i hranjivih tvari između majčine i fetalne cirkulacije, stvara hormone koji djeluju i na majčinu i na fetalnu fiziologiju te štiti fetus od majčinog imunološkog sustava (1). Bit stvaranja posteljice je uspostava krvotoka između majke i ploda. Zbog toga je pravilan razvoj i funkcija posteljice od presudne važnosti u razvoju svih sisavaca, pa tako i ljudskog fetusa. Poremećaji razvoja i funkcije posteljice dovode do poremećaja rasta, fetalnih anomalija, smrti ploda ili bolesti majke vezanih uz trudnoću. U većini slučajeva poremećaji koji dovode do komplikacija trudnoće povezani su s razvojem vaskularnog sustava posteljice (2).

Posteljica primata i glodavaca jedinstvena je po tome, što za razliku od drugih organa, stanice trofoblasta, a ne endotelne stanice, oblažu krvne žile majke (3). Kod glodavaca te se stanice nazivaju gigantske stanice trofoblasta (*engl. trophoblast giant cells, TGC*) i mogu se naći na različitim mjestima unutar majčinog vaskularnog sustava. Kod ljudi, to su stanice ekstraviloznog trofoblasta (4).

Fetalne placentarne krvne žile nalaze se u korionskim resicama koje oplahuje majčina krv, što omogućuje razmjenu otopljenih tvari i plinova između majčine i fetalne cirkulacije. Endotel fetalnih kapilara u korionskim resicama u indirektnom je kontaktu s krvlju majke preko trofoblasta koji prekriva korionske resice (vilozni trofoblast). Zbog toga se placenta u ljudi naziva hemokorijalnom (5).

Hemokorijalna cirkulacija omogućuje razmjenu tvari prema potrebama fetusa, ali ga istovremeno čini osjetljivim na promjene hemodinamskih obilježja majke kao i na promjene u svojstvima njezine krvi (npr. hipoksiju, hiperglikemiju, acidozu, toksine i sl.).

Dosadašnja istraživanja na posteljicama eksperimentalnog modela štakora pokazuju da poremećena diferencijacija trofoblasta ima ulogu u nizu promjena kako posteljice tako i fetusa (6,7,8). Iako se morfološki razlikuju, posteljice čovjeka i glodavaca sastoje se od sličnih tipova stanica. Stoga možemo pretpostaviti da su geni i proteinski produkti tih gena koji su bitni za diferencijaciju trofoblasta slični u obje vrste (9). U posljednjih su 10 godina provedena brojna istraživanja gena i proteina bitnih za diferencijaciju trofoblasta u miša i štakora, dok su slična istraživanja na humanim posteljicama tek u početnim fazama (10,11).

Smatra se da diferencijacija invazivnog trofoblasta ima zajedničke karakteristike s procesom epitelno-mezenhimne pretvorbe (*engl. epithelial-mesenchymal transition; EMT*)

koja je uključena i u malignu transformaciju (12,13). Tijekom epitelno-mezenhimne pretvorbe invazivni trofoblast proksimalnog dijela primarnih (usidrenih) resica prolazi niz promjena koje mu omogućuju postizanje mezenhimnog staničnog fenotipa (14,15,16). Smatra se da taj proces pokreću Wnt ligandi i aktivacijski put β -katenin/TCF (*engl. T-cell specific transcription factor*) (17). Nakupljanje β -katenina u jezgri često je u humanim epitelnim karcinomima, a povećan broj takvih jezgara pojavljuje se i u invazivnom trofoblastu kompletnih hidatiformnih mola (18,19,20). Stoga možemo pretpostaviti da će pojačana izraženost TCF/LEF (*engl. lymphoid enhancer factor*) u jezgrama stanica invazivnog trofoblasta ukazati na uspješnu EMT tih stanica.

SFRP1 i SFRP3 (*engl. secreted frizzled-related protein*) su inhibitori Wnt signalnog puta (21,22). Za sada je neistražena prostorna i vremenska distribucija SFRP1 i SFRP3 u normalnoj placentaciji, a pogotovo u placentama iz patoloških trudnoća. Budući da inhibitori puta koji potiče EMT sprječavaju postizanje mezenhimnog fenotipa stanica invazivnog trofoblasta, možemo očekivati njihovu pojačanu izraženost u stanjima i/ili bolestima za koje pretpostavljamo da bi mogle biti uzrokovane neuspješnom ili nedovoljnom EMT stanica ekstraviloznog trofoblasta.

Vrlo rano tijekom embrionalnog razvoja stanice se diferenciraju u budući trofoblast (trofoektoderm) i embrioblast (*engl. inner cell mass; ICM*) aktivirajući specifične gene karakteristične za navedeni tip stanica (23). To su prije svega Cdx2 (*engl. caudal-type homeodomain*) kao biljeg budućih stanica trofoblasta i Oct4 (*engl. octamer-binding transcription factor 4*) kao biljeg budućih stanica embrioblasta (24). Cdx2 je na početku prisutan u svim stanicama morule, ali se poslije, razvojem blastocela, koncentrira u jezgrama vanjskih stanica (25). Transkripcijski faktor Oct4 također je prvo prisutan u svim stanicama morule dok je kasnije ograničen na ICM te potom na epiblast (26). Smatra se da upravo Elf5 (*engl. E74-like factor 5*) predstavlja kariku između dvaju transkripcijskih faktora koji određuju sudbinu budućih stanica trofoblasta (27). On je i sam transkripcijski faktor, a djeluje kao medijator između transkripcijskih faktora Cdx2 i Eomes (28). Tijekom embriogeneze glodavaca, a na početku diferencijacije stanica trofoblasta transkripcijski faktor Elf5 je jedan od regulacijskih proteina koji nadziru diferencijaciju epitelних stanica. Kod ljudi, ELF5 regulira ekspresiju proteina SNAIL 2 koji omogućuje stanicama postizanje mezenhimnih karakteristika (29). Proučavanje njegove ekspresije također doprinosi boljem razumijevanju EMT u ljudskoj posteljici. Dosadašnji rezultati ukazuju da bi njegova upotreba kao biljega

epitelnog fenotipa stanica trofoblasta također omogućila jasniji uvid u etiologiju mnogih gestacijskih bolesti poput intrauterinog zastoja u rastu i preeklampsije (30).

1.1. RAZVOJ POSTELJICE

1.1.1. Diferencijacija trofoblasta

Oplodnjom jajne stanice nastaje zigota koja započinje prvu etapu embrionalnog razvoja – brazdanje. Do stadija morule nema razlike u građi ili funkciji pojedinih blastomera. Nakon 8-staničnog stadija zbiva se kompakcija – proces uspostavljanja stanične polarnosti. Na blastomerama se formira mikrovilima prekrivena apikalna površina te bazolateralna površina preko koje se uspostavljaju veze (*engl. gap junctions*) s odgovarajućim površinama susjednih blastomera, na kojima je izražen E-kadherin.

Prva diferencijacija u embrionalnom razvoju odvija se tijekom brazdanja u 16 – staničnom zametku kada se počinju razlikovati vanjske blastomere – prekursori trofoektodermalnih stanica koje kasnije formiraju trofoblast od unutarnjih blastomera koje formiraju unutrašnju staničnu masu – embrioblast. Trofoektodermalne stanice imaju karakteristike epitelnih stanica (31). U stadiju od 32 blastomere trofoektoderm izlučuje tekućinu u ekstracelularni prostor te nastaje blastocista (32).

Razvoj posteljice započinje stvaranjem blastociste i diferencijacijom trofoblasta. Blastocista je šuplja tvorba s vanjske strane obložena trofoblastom koji je preteča fetalnog dijela posteljice, a s unutrašnje strane se na jednom polu (embrionalni pol) nalazi nakupina stanica, embrioblast, iz kojeg će se razviti zametak i pupkovina (33).

1.1.2. Implantacija

Šestog do sedmog dana nakon oplodnje blastocista se embrionalnim polom (implantacijski pol) veže za endometrij procesom koji se naziva apozicija. Nakon odbacivanja zone pelucide blastocista prijanja uz stanice endometrija što omogućuje da adhezivne i invazivne trofoektodermalne stanice invadiraju endometrij. Na embrionalnom polu umnožavaju se stanice trofoblasta i diferenciraju u dvostruki sloj: citotrofoblast, koji nije u dodiru sa sluznicom maternice i siciotrofoblast koji nastaje spajanjem susjednih stanica citotrofoblata u jedinstvenu strukturu s mnogo jezgara. Sinciotrofoblast prodire među epitelne stanice endometrija stvarajući prstolike izdanke. Ovaj stadij u razvoju posteljice naziva se prelakunarni stadij i traje od oplodnje do 8. dana nakon začeća (33).

Slijedi lakunarni stadij koji je obilježen urastanjem sinciotrofoblasta u kapilare i venule endometrija. Tijekom tog razdoblja koje traje od 8. do 13. dana nakon oplodnje blastocista je potpuno ukopana u endometriju a površina endometrija se na mjestu implantacije obnovila i prekrivena je fibrinskim čepom. U sinciotrofoblastu oko 9. dana nastaju šupljine koje se spajaju tvoreći lakune. Sinciotrofoblast urasta u kapilare i venule endometrija. Spajanjem lakuna unutar sinciotrofoblasta s kapilarama endometrija iz okolice nastaju sinusoide iz kojih će kasnije nastati intervilozni prostor (33). Nakon implantacije blastocista izgleda poput vlasaste loptice (*engl. hairy ball*) jer se na cijeloj njezinoj površini nalazi resičasti korion (*lat. chorion frondosum*). Iz dijela resičastog koriona koji se nalazi ispod implantirane blastociste razvit će se posteljica u užem smislu, dok će se preostali korion izdignuti prema materničnoj šupljini tijekom rasta ploda i postati gladak (*lat. chorion leave*). Njegovi se ostaci mogu naći u plodovim ovojcima (33).

Istovremeno, nakon implantacije u endometriju se događaju promjene ključne za formiranje novih krvnih žila i decidualizacija stanica strome. U endometriju se povećavaju stanice strome u kojima se nakupljaju glikogen i lipidi. Tako nastaje decidua, endometriji promijenjen pod utjecajem progesterona, koji oblaže šupljinu maternice. Dio decidue koji se nalazi ispod zametka naziva se bazalna decidua (*lat. decidua basalis*) i ona čini majčinu komponentu posteljice. Dio na površini zametka je kapsularna decidua (*lat. decidua capsularis*), a ona koja oblaže ostali dio šupljine maternice je parijetalna decidua (*lat. decidua parietalis*). Nakon 15. tjedna gestacije kapsularna decidua će srasti s parijetalnom deciduom na suprotnoj stijenci maternice i tako zatvoriti materničnu šupljinu (33).

Za decidualno promijenjen endometriji hvataju se primarne resice (sidrene resice) koriona. Trofoblast koji ih okružuje naziva se vilozni trofoblast, a sastoji se od unutarnjeg sloja citotrofoblasta i vanjskog sloja sinciotrofoblasta. U ležištu posteljice iz usidrenih resica u deciduu urastaju stanice koje su po svojim morfološkim obilježjima između sinciotrofoblasta i citotrofoblasta, te se nazivaju intermedijarni trofoblast. Budući da te stanice ne okružuju resicu i aktivno infiltriraju deciduu nazivaju se još i ekstravilozni trofoblast, X stanice ili migratorni trofoblast. Te stanice u prvom tromjesečju trudnoće poprimaju invazivne osobine, prodiru kroz vanjski sloj sincicija i infiltriraju deciduu (34, 35). Zadatak ovog trofoblasta je fiziološka pretvorba spiralnih arteriola u uteroplacentne krvne žile (36,37,38), što se događa u 2 odvojena razdoblja, u dva vala invazije trofoblasta.

1.1.3. Dva vala invazije trofoblasta

Prvi val invazije događa se početkom gestacije u dijelovima spiralnih arteriola unutar decidue. Tijekom drugog vala invazije zahvaćeni su dijelovi tih žila u unutrašnjoj trećini debljine miometrija (33). Drugi val invazije završava s 20 tjedana gestacije.

Unutar prvih 12 tjedana gestacije (39) ekstravilozni citotrofoblast izvana, iz decidue prodire u lumen i zamjenjuje sve slojeve spiralnih arterija (40). Uz zamjenu endotelnih stanica stanicama trofoblasta, nestaje i glatki mišić medije, pa su spiralne arterije ekstremno dilatirane – fenomen nazvan arterijsko remodeliranje (*engl. arterial remodeling*) ili fiziološka pretvorba spiralnih arterija.

Više je mogućih mehanizama kojima se objašnjava gubitak i zamjena endotela i glatkog mišićja spiralnih arterija. Jedna teorija sugerira da se remodeliranje spiralnih arterija bazira na degradaciji ekstracelularnog matriksa koji leži ispod endotela i/ili stanica glatkog mišića što dovodi do njihove apoptoze ili promijenjene funkcije. Više je *in vivo* i *in vitro* studija na miševima pokazalo porast matriks metaloproteinaza (MMP) u stanicama trofoblasta koje se diferenciraju u gigantske stanice trofoblasta, koje u ljudskoj placenti odgovaraju ekstraviloznom trofoblastu. (41,42). Slične studije u humanim placentama pokazuju gubitak ekstracelularnog matriksa i pojavu fibrina koja koincidira s dolaskom stanica ekstraviloznog trofoblasta u uterus (43). Danas se smatra da degeneracija ekstracelularnog matriksa može biti posredovana i uterinim NK stanicama (*engl. natural killer cells*), u kojima se stvara više proteaza (40). Dokazi izvedeni usporedbom s miševima deficitarnim u uterinim NK stanicama ukazuju da upravo te stanice imaju ulogu u remodeliranju spiralnih arterija. Ovu tezu podupiru nalazi NK stanica oko spiralnih arterija u humanoj placenti *in vivo* i u studijama *in vitro* (44, 45). Ranije se smatralo da NK stanice sprječavaju prijelaz fetalnih antigena u organizam majke (46). Noviji dokazi ukazuju na kooperaciju uterinih NK stanica i trofoblasta u regulaciji remodeliranja spiralnih arterija (47). Stanice trofoblasta mogu također inducirati staničnu smrt direktnim kontaktom stanice na stanicu ili izlučivanjem citokina i faktora rasta povezanih s apoptozom (48). Osim degradacije staničnog matriksa i apoptoze, predložena je i treća mogućost bazirana na međustaničnoj komunikaciji između stanica trofoblasta i majčinih endotelних stanica s kojima se povezuju (1) te funkcioniraju kao jedna jedinica.

U svakom slučaju, fiziološka pretvorba (remodeliranje) spiralnih arterija nastaje zahvaljujući invaziji ekstraviloznog trofoblasta što je dokazano nalazima stanica ekstraviloznog trofoblasta u i oko remodeliranih spiralnih arterija u normalnim trudnoćama (49). U prvom valu invazije ekstravilozni invazivni trofoblast dakle okružuje arterije,

penetrira u lumen i u njemu se nastavlja umnažati, stvarajući čepove kojima je svrha sprječavanje naglog prodora majčine krvi pod visokim tlakom u okolinu zametka. Tijekom prvih 8 – 10 tjedana trudnoće kroz njih prolazi samo serum. Dok još ne postoji protok krvi, invaziju trofoblasta vjerojatno kontroliraju faktori koje izlučuju žlijezde uterusa, poput epidemalnog faktora rasta (*engl. epidermal growth factor*; EGF) i vaskularnog endotelnog faktora rasta (*engl. vascular endothelial growth factor*; VEGF). Za te se faktore rasta smatra da su ključni za rast i razvoj posteljice i embrija u ranom stadiju trudnoće (50).

Nakon uspostavljanja cirkulacije između majke i ploda posteljica se prebacuje s histiotrofnog na hemotrofni način prehrane (oko 12 tjedna gestacije). Čepovi se postepeno razlažu što omogućuje majčinoj krvi ulazak u lakune. Osim toga, čepovi omogućuju razvoj zametka u sredini s manjim parcijalnim tlakom kisika u odnosu na tkiva majke (51). Visoki krvni tlak i visoki parcijalni tlak kisika u krvi majke nepovoljno utječu na rani embrionalni razvoj. Neodgovarajuće stvaranje čepova intermedijarnog ekstraviloznog trofoblasta smatra se odgovornim za dio neuspješnih ranih trudnoća.

Kod uspješne invazije ekstravilozni trofoblast fenotipski se mijenja, zamjenjuje endotelne stanice, izlučuje fibrinoid (građen od fibrina, sastavnica plazme i bjelancevina) koji zamjenjuje glatke mišićne stanice arterija i elastična vlakna, pa tako nastaju široki nekontraktilni kanali malog otpora protoku krvi koji više nisu pod vazomotornom kontrolom majke. Ovi kanali dovode oksigeniranu krv u sinusoidne, a kasnije u intervilozni prostor (52,53).

Transformacija majčinih spiralnih arterija u krvne žile širokog promjera osigurava dopremu hranjivih tvari, smanjenu kontraktilnost i stalni dotok kisika uz nizak tlak do fetusa u razvoju.

Između 14. i 20. tjedna trudnoće slijedi drugi val invazije trofoblasta. Intermedijarni se trofoblast širi iz decidualnih dijelova spiralnih arteriola u njihove miometralne dijelove i preoblikuje (remodelira) ih na isti način. Stanice intermedijarnog (ekstraviloznog invazivnog) trofoblasta prodiru u miometralne dijelove spiralnih arteriola izvana iz decidue, a istovremeno ekstravilozni endovaskularni trofoblast dolazi kroz lumene tih dijelova žila invadirajući endotel i mišićni sloj iznutra. Tako se šire i miometralni dijelovi spiralnih arteriola te one postaju postaju uteroplacentne krvne žile (37,38) koje ne mogu mijenjati svoj promjer niti protok krvi. Prije trudnoće kroz spiralne arterije uterusa protok krvi je 100 ml/min, a u vrijeme termina 5 puta veći – 500 ml/min (38).

1.1.4. Razvoj korionskih resica

U ranom viloznom stadiju (13. – 28. dana nakon začeća) unutarnji sloj trofoblasta (citotrofoblast) urasta u tračke sinciotrofoblasta koji se nalaze između lakunarnih prostora, te nastaju primarne resice. Uraštanjem strome iz ekstraembrionalnog mezoderma koji potječe iz hipoblasta primitivne žumanjčane vreće, u primarne resice, nastaju sekundarne resice. Trofoblast izlučuje vaskularni endotelni faktor rasta pod čijim se utjecajem iz tog ekstraembrionalnog mezoderma razvijaju krvne kapilare, pa tako nastaju primitivne tercijarne resice. Tako se formira vaskulosincicijalna ili uteroplacentalna membrana koja se sastoji od 4 sloja: endotel kapilara resice, ekstraembrionalni mezoderm te sloj citotrofoblasta i sinciotrofoblasta (33). Citotrofoblast tercijarnih resica se stanjuje nakon 4. mjeseca gestacije, pa se tako stanjuje razmak između majčine krvi u interviloznim prostorima i fetalne krvi u žilama resica.

Iz tercijarnih se resica razvijaju mezenhimne resice koje prethode svim ostalim oblicima posteljičnih resica (54). One dominiraju u razdoblju do 8. tjedna gestacije, kasnije im se broj smanjuje iako ih se može naći i u terminskoj posteljici gdje zauzimaju manje od 1% volumena posteljice. Površinu im pokriva debeo sloj trofoblasta, osobito citotrofoblasta. U ranoj trudnoći služe za razmjenu plinova i hranjivih tvari i izlučuju hormone, a kasnije su uglavnom prekursori ostalih oblika resica.

U prva dva tromjesečja trudnoće iz mezenhimnih resica nastaju nezrele intermedijarne resice kojih je najviše u razdoblju od 14. do 20. tjedna. Također ih se može naći u terminskoj posteljici gdje čine 5-10% volumena posteljice. One postupnim sazrijevanjem postaju matične resice koje se pojavljuju također oko 8. gestacijskog tjedna. Predstavljaju 20 – 25 % volumena terminske posteljice, te služe kao mehanička potpora ostalim resicama i nemaju značajniji doprinos u fetomaternalnoj razmjeni (33).

Zrele intermedijarne resice nastaju u trećem tromjesečju također iz mezenhimnih resica. One na koncu postaju terminalne resice (33). Zauzimaju oko 25% volumena terminske posteljice, te imaju znatnu ulogu u razmjeni nutrijenata između fetusa i majke.

Terminalne resice su krajnji ogranci posteljičnih resica. Budući da su građene od oskudne vezivne strome i sinusoidalnih kapilara koje se nalaze ispod tankog pokrovnog trofoblasta stvaraju vrlo tanku vaskulosincicijalnu (uteroplacentnu) membranu pa je tako olakšana izmjena plinova i metabolita između majčine i fetalne krvi. Terminalne resice zauzimaju oko 45% volumena terminske posteljice (33).

1.2. MOLEKULARNA OSNOVA DIFERENCIJACIJE I INVAZIJE HUMANOG EKSTRAVILOZNOG TROFOBLASTA – PREGLED LITERATURE

Diferencijacija proliferirajućeg citotrofoblasta u ekstravilozni trofoblast koji invadira deciduu i krvne žile odvija se pod kontrolom niza molekularnih koraka koji su, za sada još nedovoljno jasni. To je djelomično zbog toga što se diferencijacija ekstraviloznog trofoblasta *in vitro* proučava na uzorcima posteljica iz prvog tromjesečja gestacije čije je prikupljanje ograničeno zbog etičkih razloga. Rast izdanaka trofoblasta čije će se stanice invazivno promijeniti vjerojatno uključuje parakrine faktore koji se otpuštaju iz podležće decidue poput IGF molekula (*engl. insulin-like growth factor*) koje potiču proliferaciju viloznog citotrofoblasta (vCTB) *in vitro* (55). Eksperimenti su pokazali da su spontani rast i migracija vCTB u kulturama stanica mogući bez seruma, iz čega možemo zaključiti da korijalne resice sadrže vlastite (intrinzične) molekule potrebne za proces diferencijacije. Točni mehanizmi koji kontroliraju taj proces još nisu razjašnjeni. Smatra se da ulogu mogu imati adhezivne interakcije između L-selektina izraženog u stanicama trofoblasta i njegovih ugljikohidratnih liganada (56). Različiti transkripcijski faktori poput HIF1- α (*engl. hypoxia inducible factor alpha*) i Stox 1 (*engl. storkhead box 1*) inhibiraju diferencijaciju CTB u ekstravilozni trofoblast (57). Nasuprot tome, prijenosnik signala i aktivator transkripcije STAT 3 (*engl. signal transducer and activator of transcription 3*) potiče invaziju trofoblasta dok GCM1 (*engl. glial cells missing 1*) potiče invaziju trofoblasta ali i inhibira proliferaciju vCTB (58).

Prema navedenom, možemo pretpostaviti da niz ključnih regulatornih transkripcijskih faktora kontrolira prijelaz od jednostavnog umnažanja vCTB prema diferenciranom ekstraviloznom trofoblastu (59,60). Stvaranje ekstraviloznog trofoblasta popraćeno je postupnom ekspresijom različitih integrina *in vivo* i *in vitro* (61,62). Međutim, molekularna osnova po kojoj se aktiviraju integrini u određenom stadiju diferencijacije nije poznata. Pretpostavlja se da bi značajnu ulogu mogao imati dodir s matriksom decidue kao i rast koncentracije kisika tijekom trudnoće.

Sve je više dokaza koji ukazuju da neuspješna diferencijacija ekstraviloznog trofoblasta može doprinijeti razvoju bolesti vezanih uz trudnoću. Kao mehanizam nastanka tih bolesti pretpostavlja se slabija invazija trofoblasta i neadekvatna pretvorba spiralnih arteriola u uteroplacentne krvne žile. Ekspresija proteina inhibitora vezanja DNA 2 (Id2, *engl. inhibitor of DNA binding 2*) koji blokira vezivanje bazičnih proteina s domenom uzvojnica-petlja-uzvojnica (bHLH, *engl. helix-loop-helix*) i potiče diferencijaciju, smanjuje se u ekstraviloznom trofoblastu normalnih trudnoća, dok mu razina ostaje nepromijenjena u posteljicama žena s preeklampsijom (63). U istom svjetlu, inhibicija o HIF1- α -ovisnog TGF β 3 (*engl. transforming growth factor beta 3*) koji djeluje kao negativni regulator invazije trofoblasta u *in vitro* kulturama stanica dobivenih iz posteljičnih resica žena s preeklampsijom, ponovno pokreće migraciju, naglašavajući ulogu kisika u diferencijaciji EVT (64, 65). U stanicama trofoblasta dobivenim iz posteljica žena s preeklampsijom oštećena je i funkcija EVT specifičnih gena, pa posljedično i invazija trofoblasta (66).

Istraživanja regulacije invazije trofoblasta provedena su u većem broju studija na različitim tipovima stanica trofoblasta i koriokarcinoma. Invazivne stanice trofoblasta stvaraju niz proteaza (npr. matriks metaloproteinaze (MMP), urokinaza plazminogen aktivator (uPA), katepsine) za koje se vjeruje da razgrađuju proteine ekstracelularnog matriksa decidue i tako omogućavaju invazivnost stanica. Tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMP) i inhibitori aktivatora plazminogena (PAI) stvaraju se u stanicama ekstraviloznog trofoblasta kao i u stanicama decidue kako bi ograničili dubinu prodora trofoblasta. Za brojne topive faktore koji se mogu naći na liniji feto-maternalnog dodira, a uključuju kemokine, citokine i angiogene faktore, dokazano je da potiču pokretljivost trofoblasta na autokrini ili parakrini način (67, 68, 69). Proteini koji se izlučuju stimuliraju sekreciju matriks metaloproteinaza, osobito gelatinaze MMP-2 i MMP-9. Inhibitorni proteini poput tumorskog nekrotizirajućeg faktora (*engl. tumor necrosis factor*; TNF), Nodal ili transformirajućeg faktora rasta beta (*engl. transforming growth factor β* ; TGF β) mogu ograničiti pokretljivost stanica trofoblasta povećavajući stvaranje TIMP i PAI (70, 71, 72).

Zaključci navedenih studija temelje se na promatranju stanica *in vitro*, pa ostaje nejasno imaju li svi zapaženi čimbenici zaista značajnu ulogu i *in vivo*. Moguće je da stanične linije ne iskazuju pravo ponašanje stanica trofoblasta *in vivo*. Ekspresija gena u primarnim citotrofoblastima i kulturama ekstraviloznog trofoblasta značajno se razlikuje u različitim staničnim linijama trofoblasta (73). Na primjer, u imortaliziranim trofoblastnim staničnim linijama opisani su različiti HLA profili, npr HLA-A i -B molekule što ukazuje na

aberrantnu aktivaciju tih gena tijekom imortalizacije (74). *In vivo*, vilozni citotrofoblast nema na površini izražene klasične HLA antigene; ekstravilozni trofoblast izražava HLA-C, -E i -G molekule tijekom diferencijacije.

U dostupnoj literaturi opisani su i signalni putevi za koje se smatra da su uključeni u omogućavanje veće pokretljivosti stanica trofoblasta. Brojni faktori rasta (hCG, EGF, HGF IGF2) aktiviraju MAPK kinaze; AKT/mTOR signalni put (*engl. mammalian target of rapamycin*) uključuje ekstracelularno regulirane kinaze (ERK) i fosfoinozimid 3-kinazu (PI3K), a prostaglandini djeluju preko Rho-Rock puta (69, 75). Stoga se čini da osim pojačane aktivnosti TIMP i PAI i smanjena aktivnost signalnih kinaza predstavlja mehanizam ograničavanja prodora trofoblasta.

Radovi na posteljicama mišjih mutanata opisali su hijerarhiju transkripcijskih faktora koji su potrebni za početno diferenciranje trofoektoderma. Na vrhu kaskade nalazi se TEA domena transkripcijski faktor 4 (TEAD4). On aktivira transkripcijski faktor Cdx2 (76, 77). Osovina TEAD4-Cdx2 je glavni put diferencijacije trofoblasta kod miša, ali postoje i drugi, Cdx2 neovisni faktori. Jedan od njih je GATA3 (*engl. GATA binding protein 3*) koji također može direktno aktivirati Cdx2. (78, 79). Cdx2 je potreban za ekspresiju T-box gena *Eomes* koji je jednako važan za normalnu specifikaciju i proliferaciju stanica trofoblastnih linija. (24, 80). Bez proteina *Eomes* blastocista se neće implantirati (80).

Ostali transkripcijski faktori poput Elf5, Tcfap2C (*engl. transcription factor activator protein 2C*), Ets2 (*engl. E- twenty six transcription factor*) i ESRRb (*engl. estrogen-related receptor beta*) vjerojatno dalje reguliraju kaskadu diferencijacije (81, 82, 83,84). U ranom je razvoju osobito zanimljivo međusobno djelovanje transkripcijskih faktora antagonističkog djelovanja, naročito Cdx2 i Oct4 (85). Očito da u ranom razvoju blastociste nije značajno samo postojanje ili odsutnost nekog faktora, nego relativna nadmoć jednog od njih u odnosu na drugi usmjerava blastomere u smjeru trofoblasta ili embrioblasta (27). To ujedno znači da se djelovanje pojedinog transkripcijskog faktora mijenja ovisno o njegovoj relativnoj izraženosti u različitim staničnim tipovima.

Kad se stanica jednom usmjeri prema određenoj staničnoj liniji, slijede epigenetske modifikacije koje osiguravaju stabilnost odabrane linije. Epigenetska se fiksacija javlja u stadiju kasne blastociste istovremeno s gubitkom plastičnosti blastomera (28, 86), a postiže se DNA metilacijom transkripcijskog faktora Elf5. Elf5 je hipometiliran i izražen u stanicama trofoblasta gdje ostvaruje pozitivnu povratnu spregu s Cdx2 i *Eomes* i tako učvršćuje razvoj stanica u smjeru trofoblasta i proliferaciju matičnih stanica trofoblasta. Nasuprot tome, Elf5

je metiliran i utisnut u embrioblastu od stadija kasne blastociste pa nadalje, čime je onemogućeno da se te stanice razviju u trofoblast (87). Trofoektoderm je općenito hipometiliran u odnosu na embrioblast, i takvo se stanje nastavlja i u daljnjem razvoju posteljice i zametka (88, 89). Hipometilacija je ključna za normalnu placentaciju. U posteljici dovodi do aktivacije genoma endogenih retrovirusa, a retotranspozonske sekvence koje od njih potiču osobito su bitne za razvoj posteljice. Najbolji primjer njihove važnosti su sincitini. Sincitini (*engl. syncytins*) su proteini ovojnice endogenih retrovirusa koji su ključni za razvoj siciotrofoblasta (90, 91). Izraženost im je regulirana metilacijom DNA, i hipometilirani su u stanicama trofoblasta u kojima su aktivni (92, 93).

Kako bi se otkrili novi geni i signalni putevi koji kontroliraju diferencijaciju i invazivnost trofoblasta, provedena je komparativna studija ekspresije gena u stanicama citotrofoblasta i ekstraviloznog trofoblasta izoliranih iz posteljičnog tkiva u prvom tromjesečju trudnoće. Identificirane su 3433 mRNA koje su različito izražene u te dvije populacije stanica (94). U drugom istraživanju s manjim brojem proba nađen je 991 različit prijelaz (95). Jedna od tih mRNA koja je značajno povišena u diferenciranom ekstraviloznom trofoblastu prenosi uputu za TCF-4, jedan od važnih transkripcijskih faktora Wnt signalnog puta (96). Ovo je jedan od razloga za detaljnije istraživanje Wnt signalnih komponenti i uloge tog puta u migraciji i invaziji trofoblasta u ovoj dizertaciji.

1.2.1. WNT signalni put

Wnt signalni put jedan je od nekoliko evolucijski očuvanih puteva uključenih u embriogenezu. Prijenos signala tim putem kontrolira proliferaciju stanica, razvojne procese i progresiju tumora. U embrionalno doba kontrolira formiranje rane osovine, udova i organogenezu (97). U odraslih jedinki Wnt kontrolira regeneraciju tkiva održavanjem matičnih stanica, usmjeravanjem u stanične linije i konačnom diferencijacijom (98). Neadekvatan prijenos signala Wnt putem opisan je kod različitih bolesti, npr karcinoma, dijabetesa i neurodegenerativnih poremećaja (99, 100). Najbolje istraženi put djelovanja je kanonski put, no opisani su i nekanonski putevi prijenosa signala poput Wnt/PCP (*engl. planar cell polarity*) i Wnt/Ca²⁺.

1.2.1.1. Sudionici Wnt signalnog puta

Wnt ligandi, Frizzled receptori i LRP koreceptori

Wnt glikoproteini čine obitelj signalnih molekula. Kod ljudi ih je pronađeno 19. Molekulska težina im je oko 40 kDa (101). Izlučuju ih različiti tipovi stanica (102). Sadrže 350-400 aminokiselina, a osobito su bogati aminokiselinom cistein (102). Zbog slabe topivosti u vodi izlučuju se egzocitoznim vezikulama ili putem lipoproteina (98). Jednom izlučeni, vežu se s glikozaminoglikanima ekstracelularnog matriksa i ostaju tijesno vezani uz površinu stanice (101).

Prvi opisani član obitelji je *Wnt1* proto-onkogen koji je homologan genu *Wingless* kod vinske mušice (*lat. Drosophilla melanogaster*). Isti je gen mjesto integracije za virus koji izaziva tumor dojke kod glodavaca (103), te je prvobitno dobio ime int-1. Kombinacijom dvaju naziva dobiven je termin Wnt.

Wnt ligandi vežu se na frizzled receptore u staničnoj membrani. Frizzled receptor ima aminoterminalnu cisteinom bogatu domenu koja vezuje Wnt, sedam transmembranskih domena i kratki citoplazmatski karboksiterminalni rep (104) na koji se mogu vezati PDZ domene. Pronađeno je 10 frizzled receptora koji zajedno s koreceptorom LRP-5 ili LRP-6 (*engl. low density lipoprotein receptor related protein*) čine funkcionalnu cjelinu odnosno receptor za kanonski Wnt signalni put (105).

Smatra se da složena međuigra različitih Wnt liganada s frizzled receptorima izaziva specifične Wnt odgovore u različitim tipovima stanica.

β katenin

β katenin je transkripcijski kofaktor kodiran genom *CTNNB1*. Prvobitno je otkriven vezan uz E-kadherin i α -katenin posredujući tako u spajanju adhezivnih molekula kadherina uz aktin citoskeleta (106). Sastoji se od središnje domene sastavljene od dvanaest ponavljajućih domena (nazvanih prema *armadillo* genu vinske mušice kod koje su otkriveni) te amino- i karboksi-terminalnih krajeva (107). Ta ponavljajuća domena veže se s različitim partnerima, poput kadherina, TCF, APC (*engl. adenomatous polyposis coli*) te aksina (108, 109). Slobodni terminalni krajevi također stvaraju veze, npr s β kateninom na amino-terminalnom kraju, te potiču transkripciju. Osim toga, amino-terminalni kraj sadrži aminokiseline serin i treonin koje su ključne za razgradnju β katenina.

β katenin je u stanici vezan u tzv. degradacijskom kompleksu kojeg formiraju APC, aksin i glikogen sintetaza kinaza 3 β (GSK3 β). Defosforilacija komponenti degradacijskog

kompleksa zaustavlja ubikvitaciju β katenina i istovremeno smanjuje njegov afinitet vezanja na aksin i APC. Na taj se način β katenin otpušta iz destrukcijskog kompleksa (110) te ulazi u jezgru gdje aktivira transkripcijski faktor TCF (111).

Multiproteinski degradacijski kompleks

Kompleks bjelančevina koji se sastoji od aksina (ili njegovog homologa konduktina), GSK3 β , APC i kazein kinaze 1 α (CK-1 α) ključan je za kontrolu stabilnosti β katenina. Glavna je zadaća tog kompleksa da fosforilira β katenin i tako pokrene njegovu razgradnju. Fosforiliraju se aminokiseline Ser 33, Ser 37, Ser 45 i Thr 41 β katenina. Prva se fosforilira Ser 45 pomoću CK-1 α a zatim ostale pomoću GSK3 β . Fosforilacija se odvija na aksinu koji dovodi kinaze i njihov supstrat β katenin u doticaj. Fosforilirani β katenin prepoznaje β -trCP (*engl. β -transducin repeat containing protein*) s ubikvitin ligazom nakon čijeg djelovanja slijedi razgradnja u proteosomima (112).

Glikogen sintetaza kinaza 3 β (GSK 3 β)

Glikogen sintetaza kinaza 3 β (GSK 3 β) fosforilira više proteina u Wnt signalnom putu. Fosforilacija β katenina čini ga prepoznatljivim β -TrCP i s njim povezanoj E3 ubikvitin ligazi čije djelovanje vodi do razgradnje β katenina u proteosomima. Osim toga GSK 3 β fosforilira APC i aksin. Ima i druge funkcije izvan Wnt signalnog puta (110,111).

Kazein kinaza 1 α (CK-1 α)

Za uspješno djelovanje β -TrCP, β katenin treba biti fosforiliran na 4 mjesta (aminokiseline Ser 33, Ser 37, Ser 45 i Thr 41). Ser 45 ne fosforilira GSK 3 β , već kazein kinaza 1 α (CK-1 α). Stoga se ona smatra početnom kinazom u fosforilaciji β katenina (113), a nakon njenog djelovanja slijedi fosforilacija pomoću GSK 3 β . S druge strane, kazein kinaza 1 potiče vezivanje *dishevelled* proteina GBP (*engl. GSK-3 binding protein*) te tako destabilizira destrukcijski kompleks β -katenina. Također djeluje i na aksin (113).

APC (*engl. adenomatous polyposis coli*)

APC gen je važan tumor supresor gen čija disfunkcija je vezana uz kolorektalni karcinom. Otkriven je 1991. godine kao član FAP lokusa (obiteljska adenomatozna polipoza, *engl. familial adenomatous polyposis*) (114). Njegov je produkt APC protein, koji je

sastavljen od 2843 aminokiseline (99). Pokazalo se da APC potiče razgradnju β katenina i da je vezan u kompleks s aksinom (115). Negativna regulacija Wnt signalnog puta ujedno je i njegova najbolje istraжена funkcija. Delecije APC gena u kolorektalnim tumorima rezultiraju stabilizacijom i nakupljanjem β katenina te aktivacijom o TCF/ β kateninu ovisne transkripcije ciljnih gena (116). Molekularni mehanizam kojim APC potiče destrukciju β katenina nije posve jasan budući da su pokusi *in vitro* pokazali da se razgradnja β katenina može izbjeći pojačanom ekspresijom aksina. Čini se da aktivnost APC ovisi o interakciji s aksinom (109). Vjerojatna uloga APC je njegova sposobnost vezanja β katenina putem više neovisnih veznih domena, pa tako djeluje poput “zamke” za pronalaženje i odstranjivanje β katenina iz citoplazme. Isto tako, moguće je da stimulira aktivnost aksina (117).

Aksin

Aksin (*engl. axin*) i njegov homolog konduktin (*engl. conductin*), nazvan još i aksin2 ili aksil, sadrži vezne domene za sudionike u razgradnji β katenina. To su aminoterminalna RGS domena (*engl. regulator of G-protein signaling*) kojom se veže APC (115); zasebne vezne domene za GSK 3 β i β katenin u sredini proteina (115, 118); C- terminalna DIX domena kojom se povezuje s *dishevelled* (118). Na molekularnoj razini aksin združuje sve komponente potrebne za fosforilaciju β katenina (GSK 3 β , CK 1 α APC i β katenin).

Dishevelled

Protein *dishevelled* također je sudionik Wnt signalnog puta. Kod sisavaca su poznata 3 *dishevelled* gena. Njihovi produkti aktiviraju kanonski i nekanonski PCP signalni put. *Dishevelled* ima tri interakcijska mjesta: N-terminalnu DIX domenu, kojom se veže za aksin, centralnu PDZ domenu i C- terminalnu DEP domenu, koja je vjerojatno potrebna za aktivaciju JNK (*engl. c-Jun N-terminal kinase*) (119). U kanonskom putu prenose signal aksinu odnosno degradacijskom kompleksu, a u PCP putu djeluju na RhoA/JNK. Uz *Dishevelled* se vežu različite proteinske molekule od kojih su neke aktivatori, neke antagonisti, a neke modulatori njegove funkcije. Uz njega se vežu i tri kinaze: kazein kinaza 1 potiče vezivanje *dishevelled* na GBP i tako destabilizira destrukcijski kompleks β -katenina; kazein kinaza 2 fosforilira *dishevelled* nakon aktivacije Fizzled receptora; PAR -1 (*engl. protease – activated receptor 1*) je kinaza povezana s *dishevelled*, aktivira se vezivanjem na Wnt, a potiče kanonski put dok istovremeno inhibira nekanonski JNK (120).

TCF/LEF (*engl. T-cell factor/lymphoid enhancer factor*)

TCF i LEF pripadaju obitelji transkripcijskih faktora koji aktiviraju ciljane gene. Opisana su 4 člana obitelji (TCF-1, TCF-2, TCF-3 i LEF-1). Svi članovi sadrže evolucijski očuvane grupe aminokiselina (*engl. high mobility group, HMG*) kojima se vežu na DNA molekulu kao monomeri (121). Istovrsna HMG sekvenca unutar DNA omogućava vezanje različitih transkripcijskih faktora koji mogu djelovati kao aktivatori ili represori ciljnih gena (122). Budući da TCF/LEF faktori ne mogu samostalno pokrenuti transkripciju, potreban im je koaktivator. Prvi otkriveni transkripcijski koaktivator TCF-u bio je β katenin koji se veže na TCF preko svojih ponavljajućih domena (123). Oba (C- i N-) terminalna kraja β katenina omogućuju aktivaciju transkripcije (124). Spajanje LEF-1 s C terminalnim krajem β katenina aktivira LEF-1 ovisne promotore na sličan način (124). TCF/ β katenin kompleks može se dakle smatrati dvočlanim transkripcijskim faktorom kod kojeg se vezivanje uz DNA i aktivacija transkripcije odvijaju djelovanjem dvaju zasebnih bjelančevina.

1.2.1.2. Kanonski put djelovanja Wnt signalnog puta

Najpoznatiji put djelovanja je kanonski put. Njime se regulira stabilnost β katenina i njegov odlazak u jezgru (125). U nestimuliranim stanicama β katenin se uglavnom nalazi vezan uz adhezivnu molekulu epitelnih stanica E- kadherin i α -katenin te tako održava epitelnu strukturu i polaritet. Dok nema Wnt signala, β katenin se razgrađuje pomoću destruktorskog kompleksa koji čine APC protein, aksin, CK1 α i GSK 3 β . β katenin se fosforilira pomoću enzima glikogen-sintetaze-kinaze 3 β na svom N- terminalnom kraju te tako inducira vezivanje β -trCP (*engl. β -transducin repeat containing protein*) i njemu pridružene E3 ubikvitin ligaze (*engl. E3 ubiquitin ligase*). Ovaj proces rezultira razgradnjom β katenina u proteosomima (126).

Wnt ligandi vezani za frizzled receptore s LRP-5 ili LRP-6 koreceptorom aktiviraju citoplazmatski protein *Dishevelled*, koji razgrađuje destruktorski kompleks, te inhibira fosforilaciju β katenina koju vrši GSK 3 β (127). Stoga se β katenin nakuplja u citoplazmi. Aktivni, nefosforilirani katenin ulazi u jezgru i veže se s transkripcijskim faktorima TCF i LEF te tako omogućuje prepisivanje ciljnih gena (125, 128).

TCF/LEF ne pokreću transkripciju bez koaktivatora ili korepresora. Vezivanjem β katenina transkripcijski faktori TCF/LEF mogu aktivirati brojne gene uključene u razvojne procese, stanični ciklus, diferencijaciju i staničnu invaziju. Neki od njih su: ciklin D1,

protoonkogeni c-myc i c-jun, MMP, signalni put Notch, receptor urokinaznog aktivatora plazminogena (uPAR) i mnogi drugi uključeni u Wnt signalni put. Axin, TCF ili *Frizzled* receptori često se umnažaju mehanizmom pozitivne povratne sprege nakon aktivacije signalnog puta Wnt ligandom.

Djelovanje TCF/LEF ogleda se i na drugim regulatornim transkripcijskim faktorima npr. Cdx proteinima, važnima u početnom usmjeravanju stanica u liniju trofoblasta (129).

Kompleksi TCF/ β katenin mogu i umanjiti prepisivanje nekih gena. β katenin se može povezivati i s drugim transkripcijskim faktorima (osim TCF/LEF) poput receptora za steroidne hormone, no opet ovisno o Wnt aktivaciji (130).

Antagonisti Wnt signalnog puta

Prijenos Wnt signala može biti blokiran izlučenim antagonistima (njih 11) svrstanim u dvije skupine (125):

1. Negativni regulatori Wnt signalnog puta su SFRP (*engl. secreted frizzled related proteins*) i Wif-1 (*engl. Wnt-inhibitory factor -1*). Vrlo su slični *Frizzled* receptorima i natječu se s njima za vezivanje Wnt liganada. Vežu se direktno na Wnt protein i tako sprečavaju aktivaciju receptora.

2. Antagonisti se vežu za LRP koreceptore i tako blokiraju aktivaciju Wnt signalnog puta. Ovdje ubrajamo protein Dkk1 (*engl. Dickkopf 1*) i njegova tri homologa, te protein Wise (*engl. Wnt modulator in surface ectoderm*).

1.2.1.3. Nekanonski putevi djelovanja Wnt signalnog puta

Wnt ligandi pokreću i nekanonske puteve, neovisne o β kateninu. Najbolje su istraženi Wnt/ Ca^{2+} i Wnt/PCP put (125, 131). Pokreću ih Wnt5a i Wnt11 vezivanjem na *Frizzled* receptore koji aktiviraju *Dishevelled* (Dvl) neovisno o LRP-5 ili -6 koreceptoru (132).

Wnt/PCP put je prvobitno otkriven u raznim razvojnim procesima vinske mušice. Značajan je za razvoj embrionalnih tkiva i organa, a poremećaji u prijenosu signala ovog puta potiču metastaziranje raznih tipova karcinoma (133). Na staničnoj razini regulira polarnost stanica putem organizacije citoskeleta. Vezanje liganda na receptor pokreće *Dishevelled* koji stvara kompleks s Daam1 (*engl. disheveled-associated activator of morphogenesis 1*). Daam1 aktivira mali G protein Rho. Rho aktivira ROCK (*engl. Rho-associated kinase*) enzim koji fosforilira serine i treonine u citoskeletu. *Dishevelled* stvara komplekse i s rac1 (*engl. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), koji aktivira Jun kinazu (JNK) i potiče polimerizaciju aktina (132).

Wnt/ Ca^{2+} signalni put inhibira djelovanje o cGMP-ovisne protein kinaze (*engl. cGMP-dependent protein kinase; PKG*). Ona u nestimuliranim stanicama blokira otpuštanje iona kalcija, aktivira fosfolipazu C i povisuje razinu inozitol trifosfata. Rezultat je otpuštanje kalcijevih iona iz endoplazmatskog retikuluma (134). Povišena razina kalcija u citoplazmi potiče aktivnost protein kinaze C (PKC), kalcij/kalmodulin ovisne kinaze II (CamKII) i kalcineurina. Tim se načinom u jezgri potiče djelovanje nuklearnih faktora, poput nuklearnog faktora aktiviranih T stanica (NF-AT, *engl. nuclear factor of activated T cells*) (135). Osim toga, nakupljanje Ca^{2+} nakon stimulacije Wnt5 ligandom inducira TGF- β om aktiviranu kinazu (TAK-1) i NEMO (*engl. nemo-like kinase*) koje blokiraju TCF fosforilirajući ga i tako antagoniziraju kanonski WNT signalni put (136). Djelovanje Wnt5 izrazito ovisi o vrsti receptora: vezivanje na *Frizzled* receptore 2,3,5,i 6 inducira Ca^{2+} signalni put, ali isti ligand može pokrenuti i kanonski signalni put ukoliko se veže na *Frizzled* receptor 4 i LRP (137). Neke su studije pokazale da se različiti Wnt ligandi mogu vezati i na receptor tirozin kinaze Ryk (*engl. related-to-receptor tyrosin kinase*) i Ror2 (*engl. tyrosine kinase-like orphan receptor*) te tako poticati razvojne procese neovisno o *Frizzled* receptorima ili aktivirati druge signalne puteve poput ERK ili PI3K/AKT/mTOR (138). Očito je da Wnt ligandi i različiti kanonski i nekanonski receptori čine kompleksnu regulacijsku mrežu s preklapanjima između različitih signalnih puteva.

1.2.1.4. Wnt signalni put u tkivu posteljice

U preimplantacijskom razdoblju mišje blastociste zapaženo je više Wnt liganada, *frizzled* receptora i *Dishevelled* proteina (139, 140). Više je radova na *knock-out* miševima, kojima su izbačena iz funkcije oba alela za katenin, (141, 142) pokazalo da kanonski put nije bitan za samo formiranje blastociste, ali je zato neophodan za njezinu adheziju i implantaciju. Drugi radovi ukazuju na moguću ulogu Wnt kanonskog puta u drugih vrsta sisavaca (papkari) (143), te nekanonskog Wnt/ Ca^{2+} puta (144). Također se pokazalo da inhibicija uz pomoć Dkk1 ili SFRP2 smanjuje stopu implantacije (142, 145) Uloga Wnt signalnog puta u ranom razvoju trofoblasta miševa ispitivana je izlaganjem embrionalnih matičnih stanica Wnt3a ligandima. Wnt3a inducirao je stvaranje matičnih stanica trofoektoderma koje su imale sposobnost razvoja u ostale linije mišjeg trofoblasta jer je aktivirani LEF-1 inducirao Cdx-2, ključni regulator rane diferencijacije trofoblasta (146, 147). Istraživanja na *knock-out* miševima pokazala su daljnju ulogu komponenti Wnt signalnog puta u fuziji koriona i alantoisa, razvoju

labirinta i angiogenezi posteljice (148, 149) te neadekvatnom formiranju sinciciotrofoblasta (150).

Razvoj ljudskog trofoblasta uglavnom se promatra na modelima koriokarcinoma i imortaliziranim staničnim linijama trofoblasta. Invazivna svojstva stanica trofoblasta se gube na kraju trudnoće pa se stoga pokretljivost stanica i diferencijacija matičnih stanica u ekstravilozni trofoblast istraživala u posteljicama iz prvog tromjesečja, u kulturi stanica korionskih resica i/ili izoliranih citotrofoblasta (75). Stapanje stanica trofoblasta može se proučavati i na izoliranim terminskim citotrofoblastima (151).

Ispitivanjem takvih kultura i staničnih linija dobiveni su dokazi o autokrinom djelovanju Wnt signalnog puta za vrijeme proliferacije i invazije trofoblasta (12). Semikvantitativnim RT-PCR (lančana reakcija polimeraze) pokazalo se da je u posteljici prvog tromjesečja izraženo 14 od 19 Wnt liganada, te 8 od 10 *frizzled* receptora (152). Većina otkrivenih mRNA nalazila se u viloznom citotrofoblastu. Istovremeno postojanje kanonskih i nekanonskih Wnt liganada ukazuje na djelovanje više različitih signalnih puteva u ranom razvoju trofoblasta. Razina Wnt1, 7b, 10a i 10b pada nakon prvog tromjesečja što upućuje na njihovu ulogu u trofoblastu tijekom rane trudnoće (152). *Frizzled* receptori (Fzd) 2 i 4 nađeni su u mezenhimnim stanicama resica, dok su Fzd 1, 3, 5, 6, 7 i 10 izraženi u stanicama citotrofoblasta.

Wnt4 se stvara u citotrofoblastu kao i u stanicama ekstraviloznog trofoblasta i vjerojatno doprinosi decidualizaciji endometrija kanonskim signalnim putem (153). Wnt5a može djelovati nekanonskim signalnim putem jer ne inducira prepisivanje ovisno o TCF/ β -kateninu nego mu je djelovanje antagonistično kanonskom putu (152). Progesteron stimulira izraženost Wnt11, liganda nekanonskog puta, što je dokazano u pokusima s ovariektomiranim mišicama. Wnt4 i Wnt7b, ligandi kanonskog puta potaknuti su estrogenom što vjerojatno utječe na implantaciju i decidualizaciju (154). Ova tri liganda su među najjače izraženima u stanicama citotrofoblasta. Ekspresija Wnt7b pada u vrijeme formiranja ekstraviloznog trofoblasta. Budući da je Wnt7b nezamjenjiv za razvoj mišje posteljice, može se pretpostaviti da homolog u ljudskoj posteljici također ima važnu ulogu (155). Jednako tako, i Wnt10a, Wnt10b, Fzd5 i Fzd10 jako su izraženi u citotrofoblastu, ali uglavnom nedostaju u ekstraviloznom trofoblastu ili fibroblastima posteljice. Može se stoga zaključiti da su ovi ligandi i receptori uglavnom povezani s ranim razvojem stanica trofoblasta. Glavni *frizzled* receptor u ekstraviloznom trofoblastu je Fzd6, koji djeluje unutar kanonskog i nekanonskog signalnog puta (156, 157). Različiti Wnt ligandi i receptori u

stanicama citotrofoblasta i ekstraviloznog trofoblasta ukazuju na regulaciju ovisnu o dobi trudnoće (158). To bi značilo da specifične kombinacije Wnt liganada kontroliraju postepene korake u razvoju trofoblasta i njegove funkcije.

Wnt ligandi izlučeni iz stanica ekstraviloznog trofoblasta mogli bi biti primarni regulatori ekspresije decidualnih Wnt signalnih komponenti, jer mnogi geni stanica decidue mogu biti potaknuti sustavom β -katenin/TCF (159). Osim toga, stimulacija stanica citotrofoblasta Wnt ligandima pojačava invazivnost citotrofoblasta i potiče migraciju u kulturama eksplantiranih korijalnih resica na mediju s kolagenom. Iste se pojave (invazivnost i migracija) mogu inhibirati nakon tretmana s rekombiniranim Dkk1 (18, 160). Jedan od mogućih načina kojima Wnt signalni put povećava invazivnost stanica moglo bi biti djelovanje MMP-2 koja je povišena u supernatantu kulture stanica trofoblasta nakon Wnt stimulacije, a i opisana je kao produkt ciljnog gena za TCF/ β katenin (160, 161). Aktivacija sustavom TCF/ β katenin potiče proliferaciju i pojačavanjem izraženosti regulatora staničnog ciklusa ciklina D1 (18). Iako u proliferirajućem citotrofoblastu nema TCF-4, kanonski put može biti aktivan pomoću TCF-3 koji je podjednako prisutan u stanicama citotrofoblasta i ekstraviloznog trofoblasta do 6. tjedna gestacije (18).

Epigenetska istraživanja aktivnosti Wnt signalnog puta ukazala su na važnu ulogu ovih mehanizama u regulaciji ekspresije gena posteljice i trofoblasta. Geni koji kodiraju antagoniste, odnosno negativne regulatore signalnog puta poput APC proteina i SFRP2 hipermetilirani su u trofoblastu (za razliku od drugih stanica, npr posteljičnih fibroblasta ili leukocita) (162, 163). Ovakav nalaz također ukazuje na moguću ulogu Wnt signalnog puta u placentaciji.

Iako do sada niti jedan pojedinačni Wnt niti Fzd nije istraživao u kontekstu invazije i diferencijacije humanog trofoblasta, nalazi dobiveni u mišjoj posteljici i drugim Wnt ovisnim sustavima navode na hipotezu o njihovoj mogućoj ulozi u tim zbivanjima. Podaci iz literature upućuju na ulogu kanonskog Wnt signalnog puta u proliferaciji i invaziji trofoblasta.

1.3. Epitelno - mezenhimna tranzicija (EMT)

Karakteristike epitelnih stanica su međusobna adhezija pomoću međustaničnih spojeva, adhezija na izvanstaničnu tvar ili ekstracelularni matriks (ECM) na bazalnoj površini i apiko-bazalna polarizacija. Zbog tih su svojstava stanice poredane u sloj (164). Kohezija među stanicama ovisi o međudjelovanju adhezivnih molekula kadherina, koje se vežu

pomoću adaptorskih proteina poput katenina i vinkulina za aktinski citoskelet. Osim tih spojeva, (*engl. adherens junctions, AJ*) stanice su povezane tijesnim spojevima obilježenim molekulama poput ZO-1 (*engl. zona occludens protein*) i okcludina. Spojevi nemaju samo strukturnu ulogu, već služe kao mjesta prijenosa signala među stanicama (165). U mnogim epitelnim tkivima adhezija među stanicama omogućena je i pomoću dezmosoma te različitih veznih molekula (plakoglobin, plakofilin) (166). Povezanost s ECM omogućuju prema bazalnoj površini transmembranski receptori nazvani integrini.

Nasuprot tome, mezenhimne stanice imaju slabije izražene adhezivne molekule (npr. E-kadherin i ZO-1 vinkulin) na membrani. Vezane su uz intersticijski ECM putem integrina na bilo kojem dijelu stanične površine te nemaju apiko-bazalnu polarnost nego su izdužene i multipolarne (167). Zbog tih karakteristika stanice nisu organizirane u sloj, uronjene su u ECM i mogu ispoljiti migratorni i invazivni potencijal (168).

Epitelne stanice mogu poprimiti karakteristike mezenhimnih stanica procesom nazvanim epitelno - mezenhimna tranzicija (EMT). Moguć je i obrnuti smjer preobrazbe – ponovno poprimanje epitelnih karakteristika, mezenhimno - epitelna tranzicija (MET).

Unatoč invazivnom ponašanju stanica trofoblasta, njihova invazija je u normalnim okolnostima ograničena i vremenski i prostorno. Ekstravilozni trofoblast stvara proteaze, ali i integrine (61, 62). EGF receptor 1 (EGFR1) koji je pokazatelj proliferativne aktivnosti trofoblasta i integrin $\alpha 6$, pokazatelj polariziranog epitela smanjene su aktivnosti tijekom diferencijacije ekstraviloznog trofoblasta (169). Određivanjem promjena razine mRNA koja prepisuje gene uključene u invaziju i diferencijaciju EVT nađeno je da su integrin $\alpha 6$ i EGFR1 jako izraženi u citotrofoblastu, a jedva prisutni u ekstraviloznom trofoblastu (95). U ekstraviloznom trofoblastu zato su jako aktivni geni za integrin $\alpha 1$ (ITGA1), integrin $\alpha 5$ (ITGA5) i fibronektin 1 (FN1) koji potiču migraciju stanica. Osim toga, IGF-2, FN-1, MMP-2, Notch2, uPAR, i Snail1 koji su proizvodi ciljnih gena za TCF/ β katenin također su povišeni u stanicama ekstraviloznog trofoblasta, uz istovremeno povećanje aktivnosti TCF-4. Navedeni geni kontroliraju pokretljivost stanica trofoblasta (67, 170, 171). Možemo zaključiti da aktivnost β katenina i pojačana izraženost TCF-4 u ekstraviloznom trofoblastu potiče aktivnost gena koji omogućuju migraciju stanica i njihovo invazivno ponašanje.

Epitelno - mezenhimna tranzicija (EMT) je proces u kojem epitelne stanice gube svoju polarnost i počinju nalikovati fibroblastima – dobivaju sposobnost migracije i invazije. Ovaj je proces dobro poznat u invaziji karcinomskih stanica i stvaranju metastaza (172). Obrnut smjer tranzicije je također moguć – karcinomske stanice ponovno poprimaju epitelne

karakteristike kako bi se omogućila proliferacija stanica udaljenih metastaza (mezenhimno - epitelna tranzicija, MET) (173). Analiza ekspresije gena pokazala je da se EMT javlja i u stanicama invazivnog trofoblasta koje su se prestale umnožavati čime omogućuju diferencijaciju. Pokazan je porast mRNA povezanih s EMT poput transkripata za Snail, ITGA5, ITGAB1, MMP-2, FSP1 (fibroblast specifični protein 1), dok je istovremeno smanjena aktivnost gena odgovornih za adheziju epitelnih stanica. Također je opisan prolazni gubitak adhezivnih proteina membrane poput membranskog β katenina i E –kadherina u zoni invazije primarnih (usidrenih) resica (174).

Pojačana aktivnost Wnt signalnog puta, izražen TCF/LEF i aktivnost β katenina u jezgri također su karakteristični za EMT (175).

1.3.1. Elf5 i Snail

Prva uloga transkripcijskog faktora Elf 5 je usmjeravanje blastomera u smjeru staničnih linija trofoblasta djelovanjem na gene matičnih stanica trofoblasta *Cdx2* i *Eomes*. Njegova je izraženost epigenetski regulirana. U ljudskoj posteljici prisutan je tijekom cijele trudnoće, no najizraženiji je u ranoj trudnoći, istovremeno s izraženošću proteina *Cdx2* (30).

Transkripcijski faktor Elf 5 (*engl. E74 –like factor 5*), nazvan još i ESE-2 pripada obitelji Ets (*engl. E twenty-six*) transkripcijskih faktora (176, 177) koja upravlja širokim spektrom bioloških procesa. U zdravim tkivima oni doprinose fiziološkom razvoju i diferencijaciji stanica, no mogu djelovati i kao onkogeni i kao tumor supresori (177, 178). Eksperimenti na miševima, modelima karcinoma dojke i uzorcima tkiva pacijentica pokazali su jedinstvenu ulogu Elf 5 u sprječavanju EMT i metastaziranja tumora (179).

Transkripcijski faktor Elf 5 zaustavlja EMT direktnim sprječavanjem transkripcije proteina Snail 2, koji je poznati pokretač epitelno - mezenhimne tranzicije (179). Snail priječi transkripciju staničnih adhezivnih molekula poput E –kadherina (180). Represijom proteina Snail2, Elf5 može preusmjeriti tranziciju u obrnutom, dakle MET smjeru te tako održati epitelni fenotip ciljnih stanica.

1.4. Wnt signalni put i EMT u bolestima vezanim uz trudnoću

Promjene u izraženosti gena i epigenetske modifikacije komponenti Wnt signalnog puta opisane su u različitim bolestima vezanim uz trudnoću. Kod hidatiformne mole nađen je veći broj β katenin pozitivnih jegara u ekstraviloznom trofoblastu u usporedbi s normalnim

tkivom, što navodi na zaključak da je u invazivnom tkivu pojačana ekspresija Wnt signalnog puta (18). U stanicama koriokarcinoma, geni koji kodiraju za APC i SFRP2 su hipermetilirani, što ukazuje da inaktivacija inhibitora Wnt signalnog puta doprinosi nastanku ili malignom razvoju stanica (162, 163). Inhibitor Dkk1 nedostaje u stanicama koriokarcinoma, a ponovno aktiviranje njegovog gena zaustavlja stanični rast i inducira apoptozu (181). Gubitak Dkk1 moguć je razlog proliferacije stanica tumora.

Značaj Wnt signalnog puta u invaziji i migraciji stanica opisan je kod tumorskih stanica: glioma (182), metastaza karcinoma dojke u mozgu (182), progresivnog kolorektalnog karcinoma (183), endometralnog karcinoma (184) itd. Može se dakle reći da je Wnt signalni put uključen u prijelaz epitelnog fenotipa stanica prema mezenhimnom fenotipu. U tumorima EMT omogućuje širenje tumorskih stanica, a u trudnoći invaziju trofoblasta.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da se Wnt ligandi i *Frizzled* receptori mogu pronaći u tkivu humanih posteljica (152) a pojačana ekspresija TCF3/4 i β katenina u jezgri invazivnog trofoblasta u ranim fazama placentacije (18). Isto tako, pokazalo se da dodavanje Wnt3a u kulturu stanica humanih trofoblasta inducira izlučivanje MMP2 koja može pomoći u migraciji i invaziji trofoblasta (12). Dodavanje inhibitora Wnt signalnog puta Dkk1 rezultiralo je slabijom migracijom i invazijom (18). Kod pacijentica s preeklampsijom, Dkk1 i SFRP4 su povišeni dok su Wnt2 i β katenin sniženi (185, 186). Dakle, smanjena aktivnost Wnt signalnog puta zbog povišene razine inhibitora mogla bi doprinositi poremećaju placentacije i plitkoj invaziji trofoblasta koja se nalazi u toj bolesti. Povišena razina Dkk1 nađena je i u pacijentica s ponavljanim pobačajima (187). Zanimljivo je da infekcija citomegalovirusom, koji se smatra uzročnikom spontanih pobačaja i prijevremenog poroda smanjuje proliferaciju i invaziju trofoblasta načinom koji uključuje inhibiciju Wnt signalnog puta. Virusna infekcija trofoblasta mijenja lokalizaciju β katenina i potiče njegovu razgradnju (188).

Nepotpuna invazija ekstraviloznog trofoblasta, poremećaj remodeliranja krvnih žila i ekspresije *CTB* gena karakteristike su različite patologije trudnoće poput preeklampsije ili teškog zastoja rasta (189, 190).

1.4.1. Zastoj rasta

Intrauterini zastoj rasta ploda medicinski je problem jer povisuje stopu novorođenačkog mortaliteta i morbiditeta (191). Osim toga, pokazalo se da djeca rođena s

niskom porođajnom težinom u odrasloj dobi češće obolijevaju od šećerne bolesti, ateroskleroze i poremećaja respiracijskog i kardiovaskularnog sustava, što se pripisuje fetalnom programiranju (192). Fetalni je rast uvjetovan brojnim faktorima, od genetskih do okolišnih, koje modulira posteljica (genetski potencijal rasta pojedinog fetusa koji uključuje i rasu i spol; fetalni hormoni i faktori rasta, dostupnost glukoze, aminokiselina i lipida; okolišni faktori -nadmorska visina, toksini, pušenje; socijalni status te bolesti majke u trudnoći i bolesti vezane s trudnoćom) (193, 194).

Po porodu, izmjerena težina novorođenčeta uspoređuje se s očekivanom rodnom masom za gestacijsku dob, spol djeteta i paritet majke. Krivulje, odnosno tablice rasta karakteristične su za određenu populaciju, tako da se kod nas primjenjuju vrijednosti težine novorođenčadi izmjerene u Klinici za ženske bolesti i porode u Zagrebu 1982. godine (195). Djeca čija je rodna masa manja od 10. centile za gestacijsku dob, spol i paritet majke nazivaju se malenom za gestacijsku dob (*engl. small for gestational age*, SGA). Nomalna za gestacijsku dob su djeca rodne mase između 10. i 90. centile, dok su ona iznad 90. centile velika za gestacijsku dob. Najlošiji perinatalni ishod imaju djeca ispod 3. centile, dakle ispod dviju standardnih devijacija za gestacijsku dob, spol i paritet majke (195). Klinički se zastoj rasta dijeli na asimetrični i simetrični, rani i kasni. Kod simetričnog zastoja ravnomjerno su smanjeni svi djetetovi biometrijski pokazatelji.

Kod asimetričnog zastoja u rastu smanjeno je masno tkivo ploda, te je smanjen opseg abdomena dok su ostali pokazatelji (biparijetalni promjer, opseg glave, dužina femura) primjerene veličine. Ovaj oblik zastoja najčešće nastaje zbog nedostatne funkcije posteljice.

Rani zastoj rasta nastupa prije 32. tjedna gestacije i često je uzrokovan kromosomskim anomalijama, infekcijama ili ranom insuficijencijom posteljice. Kasni zastoj nastupa u zadnjem tromjesečju trudnoće, također zbog nedostatne posteljične funkcije (196).

Razlozi insuficijencije posteljice traže se u najranijem razdoblju trudnoće, kod poremećaja prilikom implantacije ili razvoja posteljice (diferencijacije trofoblasta, preobrazbe spiralnih arterija, razvoja i vaskularizacije posteljičnih resica) (196). Premda je već odavno uočena jaka povezanost između funkcije posteljice i fetalnog rasta (197), kompleksna regulacija proliferacije i diferencijacije trofoblasta još je nedovoljno poznata. Studije na *knock-out* miševima pokazale su važnu ulogu Wnt signalnog puta u razvoju posteljice (9-12) što ukazuje na moguću povezanost poremećenog prijenosa signala tim putem i proliferacije/diferencijacije trofoblasta i fetusa (5, 155,198,199).

Oko 70% djece s rodnom masom ispod 10. centile potpuno je zdravo. Do sada nisu pronađeni razlozi koji bi objasnili slabiji rast takve djece, te se njihovo stanje naziva idiopatskim zastojem u rastu (196). Kod slijedećih 20 % djece postoji klinički prepoznat razlog, od strane majke, ploda, posteljice ili kombinacijom navedenog. Ova je skupina klinički najugroženija, jer je u podlozi zastoja rasta nedostatna funkcija posteljice koja se može prenatalno utvrditi ultrazvučnim i Doppler mjerenjima te u određenim okolnostima kardiotokografskim (CTG) zapisom. Preostalih 10% čine djeca s kromosomskim anomalijama, poremećajima razvoja organa (npr. renalna ageneza) i poremećajima razvoja (npr. mikromelija) (196). U tu skupinu ubrajamo i djelovanje infekcija (npr. rubeole, citomegalovirusa) te toksičnih učinaka iz okoline (nikotin, alkohol, toksini) koji onemogućuju fetusu da ostvari svoj genetski potencijal rasta (196).

1.4.2. Gestacijska hipertenzija, preeklampsija, eklampsija, HELLP

Porast krvnog tlaka iznad 140/90 mm Hg u drugom tromjesečju trudnoće (nakon 20. tjedna gestacije) kod trudnice koja ranije nije bolovala od hipertenzije, i čiji se tlak normalizira najkasnije 12 tjedana nakon poroda naziva se gestacijska hipertenzija. Pridruži li se povišenom tlaku proteinurija iznad 0,3 g na dan, govorimo o preeklampsiji. Preeklampsija je često popraćena edemima i zastojem u rastu ploda. Javlja se u oko 3-10% trudnoća (200). Eklampsija se klinički manifestira kloničko-toničkim grčevima uz poremećaj svijesti, a HELLP sindrom (*engl. haemolysis, elevated liver enzymes, low platelets syndrome*) padom broja trombocita na manje od $100\,000/\text{mm}^3$, povišenjem LDH, transaminaza i bilirubina uz kliničke simptome poput glavobolje ili poremećaja vida i boli u epigastriju.

Za posteljice pacijentica s hipertenzivnim poremećajem nastalim u trudnoći karakteristični su plitka invazija ekstraviloznog trofoblasta, neadekvatna pretvorba spiralnih arterija i hipoksija (33).

Pretpostavlja se da uzroci insuficijencije posteljice leže u neadekvatnoj funkciji trofoblasta (201). Do sada su opisani pojačana proliferacija progenitorskih stanica viloznog citotrofoblasta i pojačana apoptoza terminalno diferenciranog sinciciotrofoblasta. Ove promjene dovode do stanjivanja sincicijskog sloja i pojave sincicijskih čvorića (202, 203). Smatra se da je oštećenje resica uzrok slabije prokrvljenosti odnosno oksigenacije krvi interviloznog prostora (204). Za postizanje optimalne prokrvljenosti posteljice potrebna je

uspješna pretvorba spiralnih arterija invazijom ekstraviloznog trofoblasta, koji je, da bi mogao obaviti tu zadaću morao poprimiti karakteristike mezenhimnih stanica, odnosno proći epitelno - mezenhimnu tranziciju. Za proces EMT karakteristično je smanjenje izraženosti adhezivnih molekula E kadherina što je dokazano u tkivu normalnih posteljica (205). U hipertenzivnim poremećajima ekstravilozni trofoblast ne uspijeva smanjiti stvaranje E – kadherina tijekom invazije prstolika izdanaka u deciduu (206, 207). Izraženost E-kadherina regulirana je Wnt signalnim putem i/ili transkripcijskim faktorom Snail (208,209). Transkripcija proteina Snail, koji potiče EMT, pod kontrolom je više signalnih puteva (69) i faktora (uključujući Elf5), no post-transkripcijska regulacija ovisi o GSK-3 β , članu Wnt signalnog puta i HIF-1 α (210, 211).

Nepravilan razvoj posteljice dalje vodi do pretjeranog majčinog upalnog odgovora koji je u podlozi poremećene funkcije endotela i pojačane reaktivnosti vaskularnog sustava u preeklampsiji (212). Brojni se patofiziološki procesi istražuju kao mogući uzroci upalnog odgovora u preeklampsiji, npr neprilagođenost majčinog imunološkog sustava, pretjerana apoptoza trofoblasta i pojačano otpuštanje mikrovezikula trofoblasta u majčinu cirkulaciju (212, 213, 214).

Česta je povezanost hipertenzije i dijabetesa u trudnoći (215). Inzulinska rezistencija znatno se povećava u trećem tromjesečju trudnoće, dakle u vrijeme pojave gestacijske hipertenzije i preeklampsije, pa je moguće da im je patofiziološki mehanizam dijelom zajednički. Gestacijska hipertenzija i preeklampsija povezane su s inzulinskom rezistencijom (216, 217). Kao mogući načini utjecaja inzulinske rezistencije na krvni tlak navode se aktivacija simpatikusa, retencija natrija i disfunkcija endotela (215, 217). Prethodna oštećenja endotela spiralnih arterija kod dijabetesa ili kronične hipertenzije mogla bi činiti podlogu za poremećenu migraciju trofoblasta, no kada se radi o gestacijskoj hipertenziji i gestacijskom dijabetesu, mehanizam njihove povezanosti nije jasan. Opisan je utjecaj povišene razine inzulina (218), leptina (219) i izoprostana (220) na invazivnu sposobnost trofoblasta.

Razvoj posteljice u najvećoj mjeri završava na kraju drugog tromjesečja trudnoće, dok se kasnije samo povećava već stvorena masa posteljičnog tkiva. Stoga ne čudi pojava bolesti povezanih s neadekvatnim razvojem posteljice upravo nakon tog razdoblja. Poremećaji koji nastaju u prvom i drugom tromjesečju i koji dovode do promjena u tkivu posteljice odražavaju se kasnije na fetalni rast (221). Svrha je ove dizertacije pokazati upravo tu povezanost.

2. HIPOTEZA

Posteljice iz patoloških trudnoća zbog poremećene epitelno-mezenhimne tranzicije imaju jače izražene markere epitelnog fenotipa (SFRP1, SFRP3 i ELF 5), a manje izražen transkripcijski faktor (TCF1) nego posteljice iz normalnih trudnoća.

3. CILJEVI RADA

OPĆI CILJ:

Istražiti izraženost proteinskih biljega Wnt signalnog puta karakterističnih za diferencijaciju trofoblasta (SFRP1, SFRP3, TCF1) i izraženost transkripcijskog faktora ELF5 u normalnoj i patološkoj trudnoći.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Utvrditi postoje li razlike u imunohistokemijskoj izraženosti SFRP1, SFRP3, TCF1 i ELF5 faktora između normalnih posteljica različite gestacijske dobi.
2. Utvrditi postoje li razlike u imunohistokemijskoj izraženosti SFRP1, SFRP3, TCF1 i ELF5 faktora između posteljica iz normalnih i patoloških trudnoća .
3. Utvrditi postoji li korelacija izraženosti navedenih biljega s kliničkim parametrima (specifična patologija, gestacijska dob, težina posteljice i ploda, fetoplacentni omjer, dob trudnice)

Cilj ovoga rada je doprinijeti boljem razumijevanju bolesti vezanih uz trudnoću. Zbog toga smo istražili razlike u ekspresiji biljega epitelnog fenotipa (SFRP1, SFRP3, ELF5) i

mezenhimnog fenotipa (TCF1) između normalnih posteljica i posteljica iz patoloških trudnoća, te između terminskih i prijevremeno porođenih posteljica.

Smatramo da je promijenjena odnosno neadekvatna diferencijacija stanica trofoblasta u podlozi patološke trudnoće.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. MATERIJAL

Materijal na kojemu je provedeno istraživanje su uzorci posteljica prikupljeni na Klinici za ženske bolesti i porode KB Merkur,. Studiju je odobrilo Središnje etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur.Br. 380-59/12-302/88 Klasa 641-01/12-02) i Etičko povjerenstvo KB Merkur Odlukom od 22.9.2011. Prikupljene su posteljice iz patoloških i normalnih trudnoća. Rodilje su usmeno i pismeno upoznate sa svrhom i postupkom istraživanja te su dale informirani pristanak.

Kontrolnu skupinu terminskih posteljica čini 25 posteljica iz trudnoća koje su protekle bez komplikacija i porođene su u terminu (38 – 42. tjedan gestacije).

Kontrolnu skupinu prijevremeno porođenih posteljica čini 8 posteljica (31 – 36^{+5/7} tjedana gestacije). U tih 8 trudnoća koje su završile prijevremenim porodom nije bilo nikakve klinički evidentne patologije od strane majke ili ploda. Također nije bilo niti patohistološki verificiranih patoloških promjena niti infekcije posteljice. Posteljice iz ove skupine poslužile su kao kontrolna skupina uparena po dobi s prijevremeno porođenim posteljicama iz ispitivanih patoloških trudnoća.

Ispitivanu skupinu sačinjava 90 posteljica iz patoloških trudnoća; 57 je terminskih, a 33 su prijevremeno porođene. Kako se radi o heterogenoj skupini (zastoj u rastu ploda, povišeni tlak majke, gestacijski dijabetes) unutar koje postoji i kombinacija patoloških čimbenika, ispitivana skupina raščlanjena je na podskupine kako bi se detaljnije istražio utjecaj različitih patoloških zbivanja na posteljicu.

Unutar ispitivane skupine dobivena je 51 posteljica nakon rođenja novorođenčeta s intrauterinim zastojem u rastu (*engl intrauterine growth restriction, IUGR*). Zastoj u rastu definiran je kao rodna masa manja od 10. centile za dob trudnoće, spol djeteta i paritet majke prema nacionalnim tablicama definiranim 1988. godine (195, 196). Terminskih je posteljica iz trudnoća sa zastojem u rastu ploda 35, a 16 ih je porođeno prije termina.

U 25 terminskih i 7 prijevremeno porođenih trudnoća nije bilo dodatne patologije osim usporenog rasta, te je ta skupina nazvana idiopatski IUGR (222, 223).

Kod 5 terminskih i 9 prijevremeno porođenih posteljica fetalni zastoj u rastu popraćen je s povišenim tlakom majke.

Također je ispitano i 5 terminskih posteljica sa zastojem u rastu i gestacijskim dijabetesom.

Slijedeća podskupina od 24 patološke posteljice dobivena je iz trudnoća kompliciranih povišenim tlakom. Povišen tlak definiran je prema kriterijima American College of Obstetricians and Gynecologists iz 2002. godine (224). 14 je terminskih, a 10 prijevremeno porođenih posteljica. Iz ovih su trudnoća porođena djeca primjerene rodne mase za dob, spol i paritet majke.

Terminskih posteljica iz trudnoća kompliciranih samo povišenim tlakom majke bilo je 9, a prijevremeno porođenih 5.

Osim povišenog tlaka, kod 10 trudnica nađen je i gestacijski dijabetes (5 je rodilo na termin, a 5 prijevremeno). Dijagnoza gestacijskog dijabetesa postavljena je prema kriterijima HAPO studije (*engl. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcome study*) iz 1995. godine (225).

Posteljice iz trudnoća s povišenim tlakom i zastojem u rastu (5 terminskih i 9 prijevremeno porođenih) spomenute su ranije.

Posebnu podskupinu čini 8 posteljica djece s kongenitalnim anomalijama.

Zasebno je analizirano i 7 prijevremeno porođenih posteljica iz trudnoća kompliciranih samo gestacijskim dijabetesom.

Kriteriji uključivanja u studiju su zastoj u rastu ploda otkriven serijskim UZV mjerenjima (najmanje 2) s procjenom tjelesne težine ispod 10. centile za dob trudnoće, spol ploda i paritet majke, a potvrđen mjerenjem rodne mase novorođenčeta na porodu; povišen tlak trudnice iznad 140/90 mm Hg koji se pojavio prvi put nakon 20. tjedna trudnoće u pacijentice koja ranije nije bolovala od hipertenzije (gestacijska hipertenzija); povišeni tlak uz proteinuriju veću od 0,3 g/24 sata ili 0,3 g/l u uzorku urina (preeklampsija); povišeni tlak, proteinurija i klinička slika toničko-kloničnih grčeva s ili bez poremećaja svijesti (eklampsija); trombociti manji od 100 000/mm³, porast bilirubina, transaminaza i LDH s ili bez povišenog tlaka i proteinurije (HELLP sindrom; *engl. Hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets syndrome*); kongenitalna malformacija ploda.

Kriteriji isključivanja iz studije za patološke trudnoće kao i za kontrole bili su: višeplodna trudnoća, pušenje majke, intrauterine virusne infekcije (TORCH, parvoB19), korioamnionitis, kronična hipertenzija, nakalemljena preeklampsija, autoimune bolesti majke.

Makroskopska i patohistološka analiza tkiva posteljice potvrdila je promjene u skladu s dijagnozom kod patoloških trudnoća, odnosno uredan nalaz u normalnim trudnoćama. Posteljice na kojima su patohistološki nađeni znakovi infekcije isključene su iz studije bez obzira na pripadnost ispitivanoj ili kontrolnoj skupini.

4.2. METODE

4.2.1. Uzorkovanje posteljica

Nakon poroda posteljice su poslane na patohistološku analizu, što je uobičajen postupak na Klinici za ženske bolesti i porode u slučaju patoloških trudnoća. Isto je učinjeno i s posteljicama iz kontrolnih skupina. Cijelom dubinom tkiva posteljice (od fetalne do maternalne strane) izrezan je disk oko 5 cm od pupčane vrpce. Tkivo je zatim rutinskim laboratorijskim tehnikama uklopljeno u parafinske blokove.

4.2.2. Imunohistokemijska analiza

Uzorci pohranjeni u parafinskom bloku analizirani su imunohistokemijskim metodama.. Imunohistokemijska analiza korištena je da bi se ustanovile razine ekspresije i stanična lokalizacija proteina SFRP1, SFRP3, TCF1 i ELF5. Parafinski uklopljeni rezovi uzoraka debljine 4- μ m postavljeni su na silanizirana predmetna stakla (DakoCytomation, Denmark). Rezovi su imunohistokemijski bojani metodom biotin–avidin–streptavidin

peroksidazom iz hrena (engl. horseradish; DAKO No.K0679). Korištena su primarna poliklonska protutijela: SFRP1 (engl. rabbit polyclonal anti-human; Clone: sc-13939, Santa Cruz Biotechnology, USA, dilution 1:200), SFRP3 (engl. rabbit polyclonal anti-human; clone: sc-13941, Santa Cruz Biotechnology, USA, dilution 1:200), monoklonsko protutijelo TCF1 (engl. mouse monoclonal anti-human; Clone: sc-101170, Santa Cruz Biotechnology, USA, dilution 1:50) te primarno poliklonalno protutijelo Elf5 (engl. goat polyclonal anti-human; Clone sc-9645 Santa Cruz Biotechnology, USA, dilution 1:200).

4.2.2.1. Priprema za imunohistokemiju

Prije imunohistokemijskog bojanja potrebno je deparafinirati i rehidrirati tkivo što se postiže provođenjem uzoraka kroz niz ksilola u trajanju od dva puta po 5 minuta, apsolutnog i 96% alkohola u trajanju od dva puta po 3 minute, te vode u trajanju od 30 sekundi. Deparafinizirani i rehidrirani rezovi uzoraka zagrijavani su u Dako Target Retrieval Solution (Dako Corporation, USA) u mikrovalnoj pećnici 5 min. na 800 W zbog demaskiranja epitopa. Preparati su zatim tretirani s otopinom metanola i 3% H₂O₂ 5 min, radi inaktivacije endogene peroksidaze. Slijedi ispiranje u puferu PBSu, te uklanjanje nespecifičnog vezanja sa mišjim serumom u vlažnoj komori kroz 30 min na sobnoj temperaturi.

4. 2.2.2. Imunohistokemijska obrada posteljica

Uzorci su nakon opisane pripreme tretirani optimalno razrijeđenim primarnim protutijelom (SFRP1, SFRP3, TCF1) preko noći na temperaturi od 4°C. Nakon inkubacije uzorci su tri puta ispirani u puferu PBS. Za detekciju primarnog protutijela koristili smo Dako REAL Envision detection system (DakoCytomation, Carpinteria, USA). Primarno poliklonalno protutijelo Elf5 inkubirali smo preko noći na temperaturi od 4°C. Primarno protutijelo isprali smo PBS puferom, nakapali otopinom za povezivanje (biotinylated link universal, DAKO, K0690), 30 min, isprali i nakapali Streptavidin-HRP (DAKO, K0690) 30 min. Na kraju smo cijeli proces vizualizirali, u trajanju od 10 minuta, supstrat-kromogen otopinom u kojoj kao supstrat služe koncentrirani Tris-HCl pufer i 0,8% otopina vodikovog peroksida, a kao kromogen 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB). Navedena otopina se ispire destiliranom vodom. Primjena ovog supstrat-kromogen kompleksa rezultira nastajanjem netopivog smeđeg precipitata na antigenskom mjestu.

Zatim slijedi kontrastiranje hemalaunom. Uzorci se 2 minute boje u hemalaunu, koji se onda ispire destiliranom vodom. Nakon toga se uzorci 20 minuta ispiru u

vodovodnoj i 5 minuta u destiliranoj vodi, te se dehidriraju provođenjem kroz uzlazni niz etilnog alkohola (96%EtOH, 100% EtOH) i ksilol u kojem se preparati izbistre. Obrada završava poklapanjem pokrovnim stakalcem i medijem za pokrivanje koji se koristi u rutinskoj histološkoj dijagnostici. Negativna kontrola tijekom eksperimenta bio je uzorak koji nismo inkubirali s primarnim antitijelom tijekom imunohistokemije.

4.2.3. Imunofluorescencija

Predigestijska priprema preparata za imunofluorescenciju ista je kao i kod imunohistokemije. Parafinske rezove posteljica debljine 4 μm , deparafinirali smo inkubacijom u termostatu kroz noć na temperaturi 56°C-60°C uz dodatno provođenje kroz red ksilola slijedećeg dana. Rehidriraciju preparata postigli smo provođenjem kroz silazni niz etilnog alkohola (100%EtOH, 96%EtOH, 70%EtOH) i ispranjem u destiliranoj vodi, a zatim TBS puferu. Za demaskiranje antigena koristili smo citratni pufer (pH 6,0) u kojem smo kuhali preparate u vodenoj kupelji 30 min na temperaturi od 95°C-100°C. Da bi smo izbjegli nespecifično bojanje pozadine, na ohlađene preparate nakapali smo blocking peroksidazu, inkubirali 5 min i isprali TBS puferom. Razrijeđeno primarno protutijelo Elf5 (Elf-5 (N-20): sc-9645 Santa Cruz) u omjeru 1:200 μl s otopinom za razrijeđivanje protutijela (DAKO, S2022) inkubirali smo kroz noć u tamnoj posudi na 4°C. Nakon što smo TBS puferom isprali preparate, nakapali smo na preparate sekundarno fluorescentno obilježeno protutijelo u razrjeđenju 1:200 μl (Alexa 488; Invitroge,) i inkubirali 2h. Medij za pokrivanje koji sadrži boju DAPI (diamidino-2-fenolindol) i boji jezgre plavom bojom, stavljali smo nakon ispiranja sekundarnog protutijela TBS puferom i poklopili pokrovnim stakalcem. Dobivene signale analizirali smo i fotografirali fluorescentnim mikroskopom Olympus 70XS.

4.2.4. Stereološka kvantitativna analiza

Za stereološku analizu korišten je binokularni svjetlosni mikroskop "Nikon Alphaphot". Rezovi su analizirani pomoću Weibelovog mnogonamjenskog testnog sustava s 42 točke za testiranje (226), pri povećanju od 400x, te je ukupna duljina testnih linija (Lt) iznosila 1,008 mm, a testna površina (At) 0,0837 mm² za svako analizirano mikroskopsko polje.

Veličina uzorka, tj. broj vidnih polja na kojima smo proveli mjerenje određena je nakon analize uzorka na 10 polja i uz 95%-tni interval povjerenja prema, formuli:

$$„n“ = (200/y \cdot s/x)^2$$

gdje je „n“ broj polja koje treba analizirati, $\bar{x}$ je aritmetička sredina orijentacijskog uzorka, s je standardna devijacija orijentacijskog uzorka i y je dopušteno odstupanje od rezultata aritmetičke sredine (226). Izračunati broj „n“ predstavlja broj testnih polja koje treba stereološki analizirati pri 95% intervalu povjerenja, da rezultat ne bi odstupao od vrijednosti prosjeka za više od 10%.

Pomoću Weibelovog mnogonamjenskoga testnoga sistema brojale su se SFRP1, SFRP3, TCF1 i Elf5 pozitivne stanice trofoblasta u bazalnoj decidui i posteljičnim resicama, nakon čega je slijedilo izračunavanje volumenske gustoće. Volumenska gustoća (V_v) je relativna stereološka varijabla koja pokazuje koliki dio sveukupnog prostora zauzima proučavana faza ili koliki je postotak proučavane faze u jedinici volumena (226). Volumenska gustoća je bez dimenzije. Volumenska gustoća (V_v) je izračunata prema formuli:

$$V_v = P_f / P_t$$

P_f = broj pogodaka testnih točaka na proučavanu fazu

P_t = broj svih testnih točaka unutar testnog polja

Također, pomoću Weibelovog mnogonamjenskog testnog sistema brojale su se TCF1 pozitivne stanice u bazalnoj decidui i posteljičnim resicama, nakon čega je slijedilo izračunavanje numeričke gustoće. Numerička gustoća (N_v) je relativna stereološka varijabla koja nam daje podatak o broju čestica u jedinici prostora (mm^3) (226, 227). Broj profila čestica u ravnini presjeka (N_A) je razmjeran produktu njihove numeričke gustoće (N_v) i njihovog prosječnog tangentnog promjera D (227) što se vidi iz jednadžbe:

$$N_A = N_v \cdot D$$

Iz nje možemo izraziti numeričku gustoću:

$$N_v = N_A / D$$

Nakon što su prebrojeni profili čestica (N) na testnom arealu (A_t) izračunat je njihov kvocijent $N_A = N / A_t$, te uvršten u prethodnu formulu, pa se dobiva slijedeće:

$$N_v = N / A_t \cdot D$$

Prosječni tangentni promjer izračunat je pomoću Elipse 3D programa i on za 100 stanica iznosi $D = 0,0054 \text{ mm}$, a površina testnog areala $0,0837 \text{ mm}^2$. Koristeći ove vrijednosti izračunata je numerička gustoća pozitivnih stanica u posteljici.

4.2.5. Statističke metode

U statističkoj obradi dobivenih podataka koristila se srednja vrijednost, standardna pogreška i Studentov t-test u uvjetima normalne raspodjele ili Mann Whitney test ako to nije

bio slučaj. Priznata je kao značajna razlika na razini stupnja vjerojatnosti od $p < 0,05$. Distribucija podataka testirana je pomoću Kolmogorov-Smirnov testa, Lilliefors testa i Shapiro-Wilks W-testa. Razlike u volumenskoj gustoći SFRP1, SFRP3, TCF1 i ELF5 - pozitivnih stanica u istraživanim skupinama analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunn-ovim testom. Za statističku analizu korišten je program GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

5. REZULTATI

Ekspresiju proteina SFRP1, SFRP3, TCF1 i ELF5 istraživali smo u kontrolnim terminskim i kontrolnim prijevremeno porođenim posteljicama te je usporedili s posteljicama iz terminskih odnosno prijevremeno porođenih patoloških trudnoća. Zatim smo kontrolne terminske i prijevremeno porođene posteljice usporedili međusobno kako bismo utvrdili razlike između normalnih posteljica različite gestacijske dobi. Potom smo ispitivanu skupinu patoloških posteljica podijelili u podskupine kako bismo istražili utjecaj specifične patologije na izraženost ispitivanih biljega.

5.1. Ekspresija proteina SFRP1

Ekspresiju proteina SFRP1 istraživali smo u kontrolnim terminskim i kontrolnim prijevremeno porođenim posteljicama te u slijedećim patološkim stanjima:

1. Terminski idiopatski IUGR
2. Idiopatski prijevremeno porođeni IUGR
3. IUGR uz povišeni krvni tlak u terminskim trudnoćama
4. IUGR uz povišeni krvni tlak u prijevremenim porodima
5. Povišeni krvni tlak uz eutrofičnu djecu – terminski porodi
6. Povišeni krvni tlak uz eutrofičnu djecu - prijevremeno porođeni
7. Prijevremeno porođeni s gestacijskim dijabetesom
8. Povišeni krvni tlak uz gestacijsku šećernu bolest– terminski i prijevremeni
9. IUGR uz gestacijski dijabetes - terminski
10. Anomalije ploda

Svi klinički parametri koje smo pratili kod pacijentica u kontrolnoj skupini terminskih odnosno prijevremenih poroda navedeni su u Tablicama 1 i 2. Od dvadeset i pet pacijentica uključenih u studiju, koje su rodile u terminu, četiri su rađale treći put dok su sve ostale bile prvorotkinje ili drugorotkinje. Samo dvije su imale carski rez dok su se preostale porodile vaginalno. U kontrolnoj skupini prijevremeno porođenih bilo je 8 zdravih pacijentica koje su rodile zdravu djecu primjerene težine za dob trudnoće, spol i paritet majke. Šest rođilja bile su prvorotkinje, jedna drugorotkinja, a jedna je rodila treći put. Četiri su rodile carskim rezom a četiri vaginalno. U Tablici 3 prikazali smo prosječnu tjelesnu duljinu i težinu zdrave djece kao i prosječnu masu posteljice te fetoplacentalni omjer.

Tablica 1. Klinički podaci o trudnicama uključenim u terminsku (n=25) i prijevremenu (n=8) kontrolnu skupinu istraživanja (srednja vrijednost $\pm$ standardna greška). (TV= tjelesna visina; TT= tjelesna težina; BMI= indeks tjelesne mase (*engl. body mass index*))

	Dob	TV majke (cm)	TT majke kod poroda (kg)	Prirast TT	BMI	BMI prije trudnoće
Terminska kontrola	28,8 $\pm$ 0,87	168,2 $\pm$ 0,94	76,3 $\pm$ 1,81	16,16 $\pm$ 0,85	26,95 $\pm$ 0,57	21,26 $\pm$ 0,48
Prijevremena kontrola	28 $\pm$ 2,12	167,4 $\pm$ 1,93	72,75 $\pm$ 2,22	11,38 $\pm$ 0,68	26,03 $\pm$ 0,97	21,94 $\pm$ 0,83

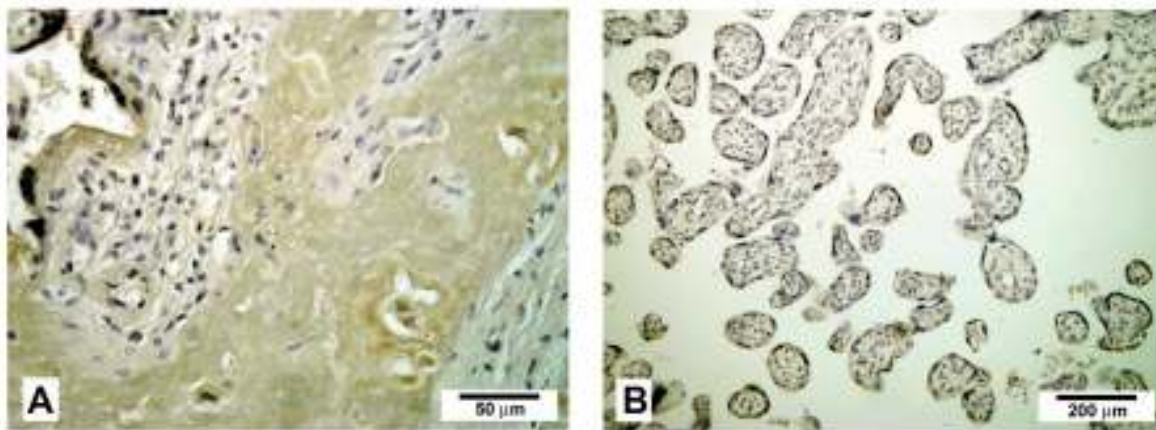
Tablica 2. Rezultati OGTT-a, krvnog tlaka te prosječna gestacijska dob u zdravoj trudnoći (srednja vrijednost $\pm$ standardna greška). OGTT = oralni test opterećenja glukozom; RR krvni tlak

	OGTT 0'	OGTT 60'	OGTT 120'	Gestacijska dob	RR sistolički	RR dijastolički
Terminska kontrola	4,39 $\pm$ 0,08	5,23 $\pm$ 0,17	5,63 $\pm$ 0,31	39+3/7	117,8 $\pm$ 1,83	74 $\pm$ 1,16
Prijevremena kontrola	4,51 $\pm$ 0,24	8,57 $\pm$ 0,27	5,56 $\pm$ 0,44	34 +2/7	123,1 $\pm$ 2,1	79,38 $\pm$ 2,4

Tablica 3. Klinički parametri zdrave terminske (n=25) i prijevremeno rođene (n=8) novorođenčadi. (srednja vrijednost $\pm$ standardna greška). TT= tjelesna težina; F/P omjer = fetoplacentalni omjer

	TT ploda (g)	Duljina ploda (cm)	Masa posteljica (g)	F/P omjer
Terminska kontrola	3488 $\pm$ 73	50,84 $\pm$ 0,24	613,2 $\pm$ 40,68	6,19 $\pm$ 0,38
Prijevremena kontrola	2583 $\pm$ 293,4	46,88 $\pm$ 1,2	467,5 $\pm$ 39,94	5,21 $\pm$ 0,41

Ekspresija proteina SFRP1 izražena je u citoplazmi decidualnih stanica (Slika 1A) te u korionskim resicama (Slika 1B).



Slika 1. Ekspresija proteina SFRP1 u decidui (A) i u resicama kontrolnih terminskih posteljica (B). (DAB, kontrastirano hemalaunom).

5.1.1. Ekspresija proteina SFRP1 u patološkim terminskim i patološkim prijevremeno porođenim posteljicama

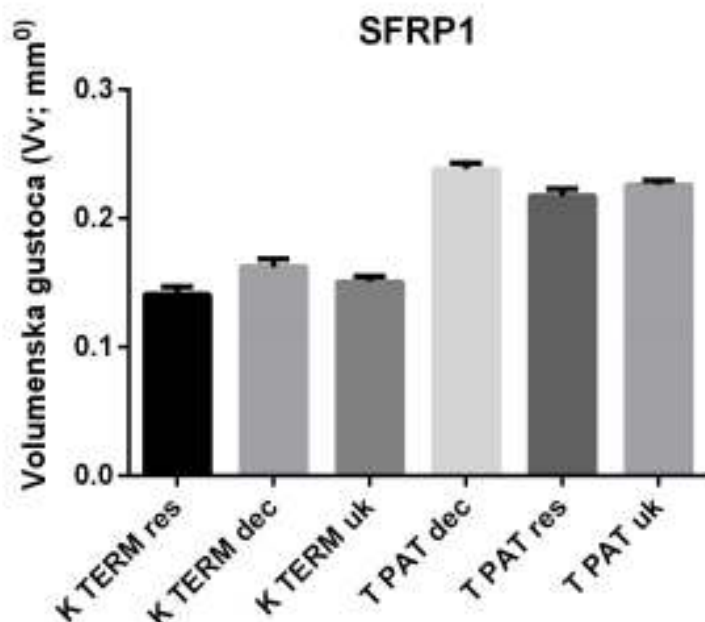
Usporedili smo ekspresiju proteina SFRP 1 u kontrolnim terminskim posteljicama (n= 25) s ekspresijom u terminskim posteljicama iz patoloških trudnoća (n= 57).

Ekspresiju SFRP1 proteina analizirali smo zasebno u decidui i u korionskim resicama. Statistički značajno izraženiju ekspresiju ovog antigena izmjerili smo u terminskim posteljicama iz patoloških trudnoća u usporedbi s terminskim kontrolama kako u decidui tako i u korionskim resicama. Također smo usporedili cjelokupnu ekspresiju ovog proteina u obje skupine posteljica te dobili statistički značajno veću ekspresiju u patološkim posteljicama. Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kuskal Wallis ANOVA a post hoc testiranje je načinjeno Dunnovim post hoc testom. Rezultate smo prikazali u Tablici 4 i na Slici 2.

Tablica 4.. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u terminskim kontrolnim posteljicama i terminskim posteljicama iz patoloških trudnoća

Volumenska gustoća ($V_v; \text{mm}^0$)	Kontrola (terminska)	Terminske posteljice iz patoloških trudnoća	p vrijednost
Decidua	0.1625 ± 0.005954	0.2381 ± 0.004771	< 0,0001
Korionske resice	0.1408 ± 0.006168	0.2174 ± 0.005649	< 0,0001
Ukupna ekspresija	0.1506 ± 0.004358	0.2258 ± 0.003908	< 0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 2. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u decidui i korionskim resicama te ukupna ekspresija u kontrolnim terminskim posteljicama i terminskim

posteljicama iz patoloških trudnoća (K TERM dec=terminske kontrole decidua; K TERM res= terminske kontrole resice; K TERM uk= ukupna ekspresija u terminskim kontrolama; T PAT dec= terminska patologija decidua; T PAT res= terminska patologija resice; T PAT uk= ukupna ekspresija u terminskim patološkim posteljicama)

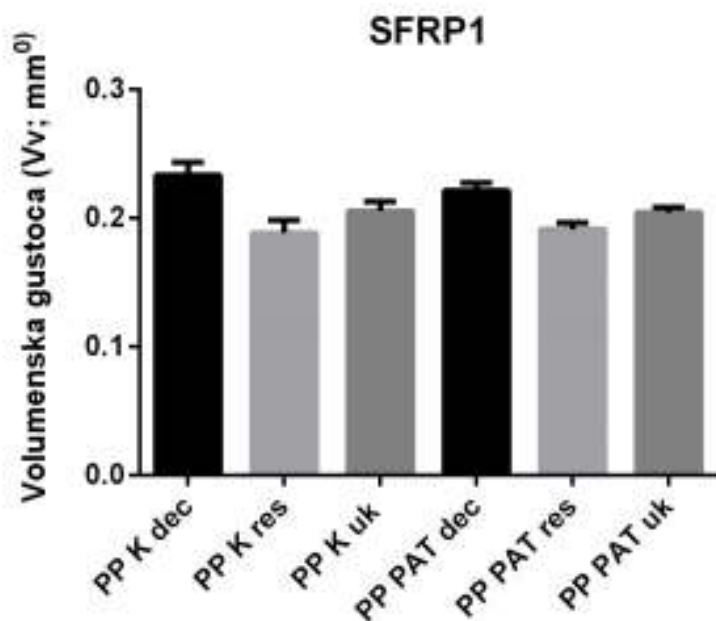
Jednako tako, usporedili smo kontrolne prijevremeno porođene posteljice (n=8) s prijevremeno porođenim posteljicama iz patoloških trudnoća (n = 33)

Nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji SFRP1 antigena između prijevremeno porođenih kontrolnih posteljica i prijevremenih posteljica iz patoloških trudnoća ni u decidui ni u korionskim resicama. Usporedili smo i cjelokupnu ekspresiju ovog proteina u obje skupine posteljica te također nismo dobili statistički značajnu razliku među skupinama. Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kruskal Wallis ANOVA a post hoc testiranje je načinjeno Dunnovim post hoc testom. Rezultate smo prikazali u Tablici 5 i na Slici 3.

Tablica 5. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v , mm^0) u kontrolnim prijevremeno porođenim posteljicama i posteljicama iz prijevremeno porođenih patoloških trudnoća

Volumenska gustoća (V_v ; mm^0)	Kontrola (prijevremena)	Prijevremene posteljice iz patoloških trudnoća	p vrijednost
Decidua	0.2336±0.009750	0.2215±0.006035	ns
Korionske resice	0.1926±0.009558	0.1915±0.005027	ns
Ukupna ekspresija	0,2085±0.007196	0.2045±0.003932	ns

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = nesigifikantno, $p > 0,9999$)



Slika 3. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (Vv, mm⁰) u decidui i korionskim resicama te ukupna ekspresija u kontrolnim prijevremeno porođenim posteljicama i prijevremeno porođenim posteljicama iz patoloških trudnoća (PP K dec= prijevremene kontrole decidua; PP K res= prijevremene kontrole resice; PP K uk= ukupna ekspresija u prijevremenim kontrolama; PP PAT dec= prijevremena patologija decidua; PP PAT res= prijevremena patologija resice; PP PAT uk= ukupna ekspresija u prijevremenim patološkim posteljicama)

5.1.2. Ekspresija proteina SFRP1 u posteljicama kod prijevremenih poroda bez pridružene patologije (kontrolne prijevremene posteljice)

U skupini prijevremenih poroda bez druge patologije sakupili smo osam posteljica. Ovu skupinu koristili smo kao kontrolnu skupinu prijevremenih poroda za usporedbu s prijevremeno porođenim posteljicama iz patoloških trudnoća. Klinički parametri roditelja, tjelesna težina i duljina prijevremeno rođene djece kao i mase posteljica prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6 . Klinički podaci majki i djece kod prijevremenih poroda bez pridružene patologije. (Kontrolna skupina prijevremenih poroda)

	Normalne (kontrolne) terminske trudnoće (n=25)	Normalne (kontrolne) prijevremeno porođene trudnoće (n=8)	p vrijednost
Dob majke	28,8±0,87	28±2,12	0,7419
Paritet	1,560±0,15	1,375±0,26	0,6234
Graviditet	1,640±0,16	1,75±0,25	
Tjelesna visina majke (cm)	168,2±0,94	167,4±1,93	0,5134
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	76,3±1,81	72,75±2,22	0,3671
Prirast tjelesne težine (kg)	16,16±0,85	11,38±0,68	0,0018
BMI	26,95±0,57	26,03±0,97	0,4889
BMI prije trudnoće	21,26±0,48	21,94±0,83	0,5426
OGTT 0'	4,39±0,08	4,51±0,24	0,5038
OGTT 60'	5,23±0,17	8,57±0,27	0,1
OGTT 120'	5,63±0,31	5,56±0,44	0,7128
Trajanje gestacije	39+3/7 (raspon 38 ^{+1/7} -41 ^{+2/7})	34 +2/7 (raspon 31-36 ^{+5/7})	p<0,0001
Sistolički krvni tlak	117,8±1,83	123,1±2,1	0,0953
Dijastolički krvni tlak	74±1,16	79,38±2,4	0,0583
Tjelesna težina ploda (g)	3488±73	2583±293,4	0,0071
Tjelesna duljina ploda (cm)	50,84±0,24	46,88±1,2	0,0039
Masa posteljica (g)	613,2±40,68	467,5±39,94	0,0254
Fetoplacentalni omjer	6,19±0,38	5,21±0,41	0,0711
Spol djeteta			
Muško	14	4	
Žensko	11	4	
Način poroda			
Carski rez	2	4	
Vaginalni porod	23	4	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa (p<0,05) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Tjelesna težina djeteta, duljina djeteta i težina posteljice statistički su značajno veći u kontrolnim terminskim trudnoćama u usporedbi s istim parametrima dobivenim nakon prijevremenih poroda (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Također je statistički značajna razlika u trajanju gestacije u uspoređivanim skupinama.

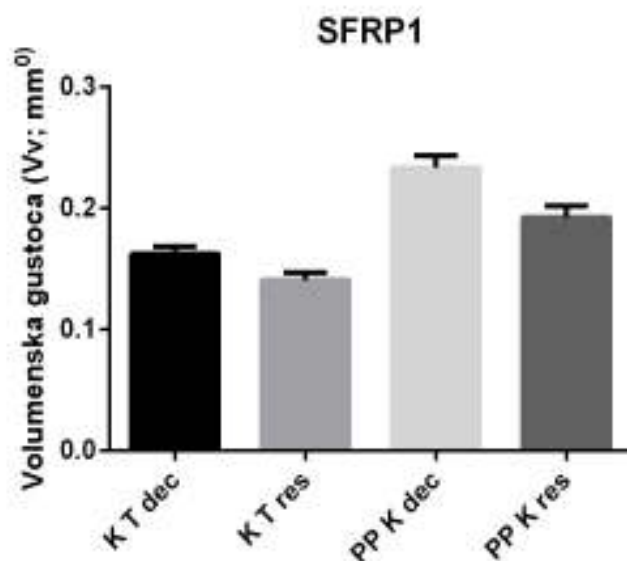
Klinički parametri trudnica te statistički značajne razlike između terminske kontrolne skupine i zdravih prijevremenih roditelja (kontrolne skupine prijevremenih poroda) prikazani su u istoj tablici. Statistički značajna razlika nađena je samo kod prirasta tjelesne težine, što je očekivano jer je u skupini prijevremeno porođenih roditelja trudnoća trajala kraće. U svim ostalim promatranim parametrima nema statistički značajne razlike između trudnica kontrolne terminske skupine i onih koje su rodile prije vremena.

Ekspresiju SFRP1 proteina analizirali smo zasebno u decidui i u korionskim resicama. Statistički značajno izraženiju ekspresiju ovog antigena izmjerili smo u posteljicama kod prijevremenog poroda u usporedbi s normalnim terminskim posteljicama kako u decidui tako i u korionskim resicama. Također smo usporedili cjelokupnu ekspresiju ovog proteina u obje skupine posteljica te dobili statistički značajno veću ekspresiju u prijevremeno porođenim posteljicama. Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kruskal Wallis ANOVA a post hoc testiranje je načinjeno Dunnovim post hoc testom.

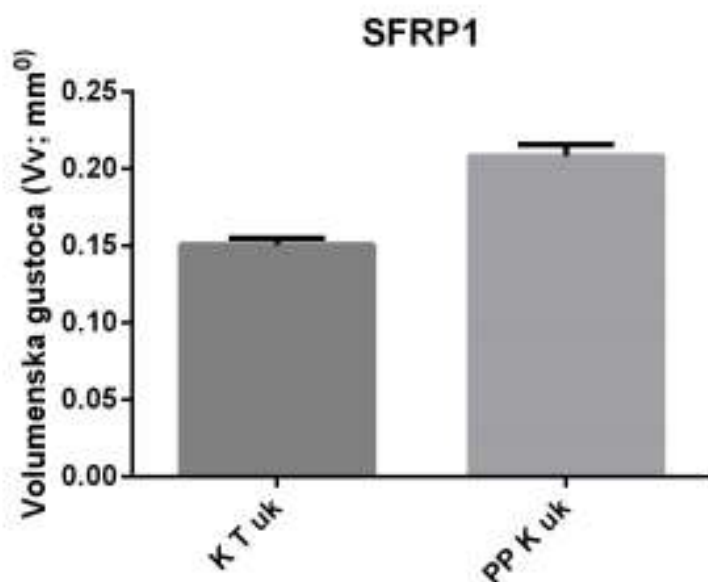
Tablica 7. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u normalnim terminskim i prijevremeno porođenim posteljicama.

Volumenska gustoća ($V_v; \text{mm}^0$)	Normalne (kontrolne) terminske posteljice	Normalne (kontrolne) prijevremeno porođene posteljice	p vrijednost
Decidua	0.1625 ± 0.005954	0.2336 ± 0.009750	< 0,0001
Korionske resice	0.1408 ± 0.006168	0.1926 ± 0.009558	< 0,0001
Ukupna ekspresija	0.1506 ± 0.004358	0.2085 ± 0.007196	< 0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

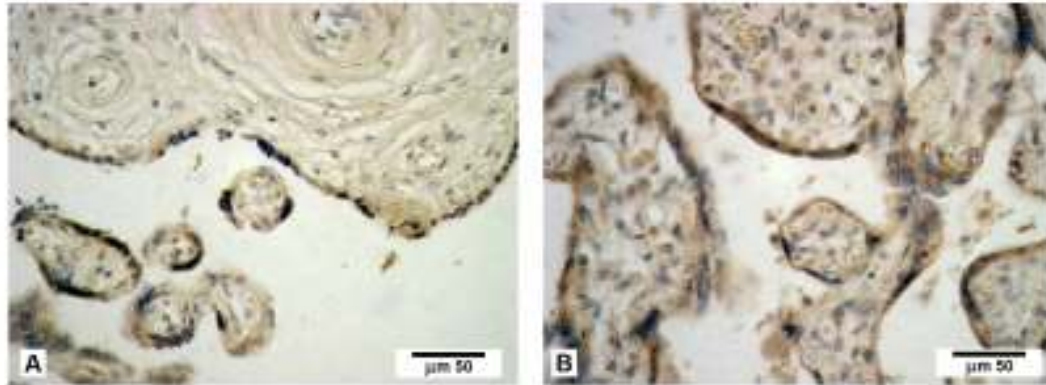


Slika 4. Ekspresija proteina SFRP1 u decidui i korionskim resicama kontrolnih terminskih posteljica i posteljica iz prijevremenih poroda bez druge pridružene patologije (K T dec = terminske kontrole decidua; K T res= terminske kontrole resice; PP K dec= prijevremeno porođene kontrole decidua; PP K res= prijevremeno porođene kontrole resice)



Slika 5. Ukupna ekspresija proteina SFRP1 u kontrolnim terminskim posteljicama (K T uk) i posteljicama iz prijevremenih poroda bez druge pridružene patologije (PP K uk)

Ekspresiju proteina SFRP1 uočili smo u citoplazmi decidualnih stanica te u korionskim resicama (Slika 6).



Slika 6. Ekspresija proteina SFRP1 u posteljici iz prijevremenog poroda bez druge pridružene patologije. (DAB, kontrastirano hemalaunom).

5.1.3. Ekspresija proteina SFRP1 u posteljicama kod terminskog idiopatskog zastoja u rastu ploda (IUGR)

U skupini idiopatskog zastoja u rastu sakupili smo dvadeset i pet terminskih posteljica. Klinički parametri roditelja te tjelesna težina i duljina rođene djece kao i težina posteljica prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Klinički parametri majki i djece kod terminskog idiopatskog IUGR-a.

	Kontrola(terminska) (n=25)	Terminski idiopatski IUGR (n=25)	p vrijednost
Dob majke	28,8±0,87	30,64±1,29	0,1890
Paritet	1,56±0,15	1,88±0,31	0,6928
Graviditet	1,64±0,16	2,28±0,42	0,5592
Tjelesna visina majke (cm)	168,2±0,94	164,8±1,19	0,0439
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	76,3±1,81	70,92±2,21	0,0487
Prirast tjelesne težine (kg)	16,16±0,85	12,68±1,03	0,0172
BMI	26,95±0,57	26,1±0,77	0,1935
BMI prije trudnoće	21,26±0,48	21,43±0,73	0,6825
OGTT 0'	4,39±0,08	4,59±0,08	0,0662
OGTT 60'	5,23±0,17	6,72±1,06	0,3429
OGTT 120'	5,63±0,31	5,17±0,42	0,3639
Trajanje gestacije	39+3/7 (raspon 38 ^{+1/7} - 41 ^{+2/7})	38+6/7 (raspon 37 ^{+4/7} -40 ^{+5/7})	
Sistolički krvni tlak	117,8±1,83	122,0±1,28	0,0666
Dijastolički krvni tlak	74±1,16	74,6±1,22	0,5513
Tjelesna težina ploda (g)	3488±73	2407±34,11	< 0,0001
Tjelesna duljina ploda (cm)	50,84±0,24	46,48±0,34	< 0,0001
Masa posteljica (g)	613,2±40,68	382±13,9	< 0,0001
Fetoplacentalni omjer	6,19±0,38	6,48±0,22	0,5221
Spol djeteta			
Muško	14	8	
Žensko	11	17	
Način poroda			
Carski rez	2	14	
Vaginani porod	23	11	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa (p<0,05) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Tjelesna težina djece i duljina djece kao i masa posteljice statistički su značajno veće u kontrolnim terminskim trudnoćama u usporedbi s istim parametrima dobivenim kod terminskog idiopatskog IUGR-a (Mann Whitney test; p<0,05).

Statistički značajno veća je i tjelesna visina majke, tjelesna težina majke kod poroda i prirast tjelesne težine majke u kontrolnoj skupini nego u skupini trudnica koje su rodile djecu s idiopatskim IUGR.

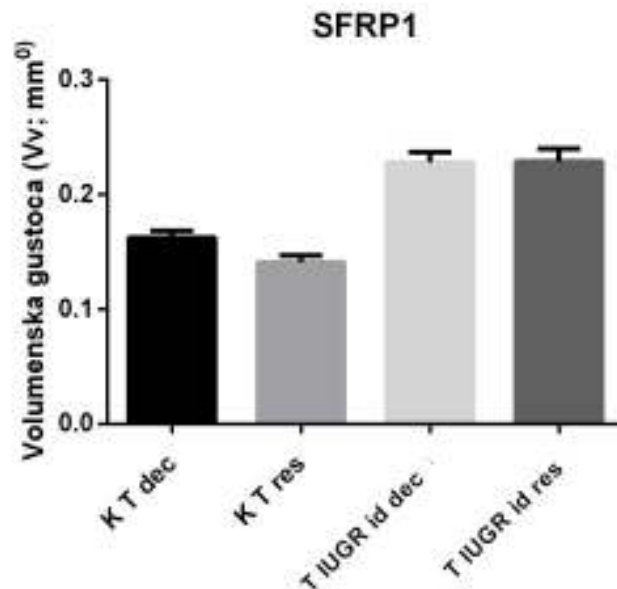
Ekspresiju SFRP1 proteina analizirali smo zasebno u decidui i u korionskim resicama. Statistički značajno izraženiju ekspresiju ovog antigena izmjerili smo u posteljicama kod terminskog idiopatskog IUGR-a u usporedbi s terminskim kontrolama kako u decidui tako i u korionskim resicama (Tablica 9).

Tablica 9. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v , mm^0) u posteljicama kod idiopatskog terminskog IUGR-a te kontrolama.

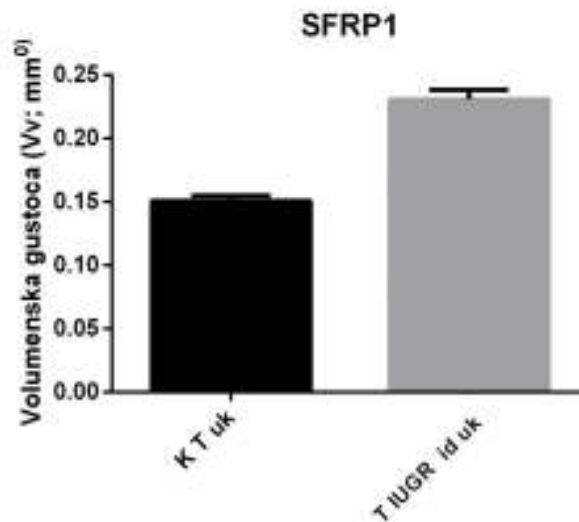
Volumenska gustoća (V_v ; mm^0)	Kontrola (terminska)	Terminski idiopatski IUGR	p vrijednost
Decidua	0.1625±0.005954	0.2278±0.008855	< 0,0001
Korionske resice	0.1408±0.006168	0.2287±0.01082	< 0,0001
Cijela posteljica	0.1506±0.004358	0.2307±0.007257	< 0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom i prikazali na Slici 7. Također smo usporedili cjelokupnu ekspresiju ovog proteina u obje vrste posteljica te dobili statistički značajno veću ekspresiju u patološkim uzorcima (Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom; $p < 0,05$) (Slika 8).



Slika 7. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u decidui i korionskim resicama kontrolnih terminskih posteljica i terminskih posteljica iz trudnoća s idiopatskim zastojem u rastu ploda (IUGR). (K T dec=terminske kontrole decidua; K T res= terminske kontrole resice; T IUGR id dec= terminski idiopatski IUGR decidua; T IUGR id res= terminski idiopatski IUGR resice)



Slika 8. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u terminskim kontrolnim posteljicama (K T uk) i u terminskim posteljicama iz trudnoća s idiopatskim zastojem u rastu ploda (IUGR) (T IUGR id uk).

5.1.4. Ekspresija proteina SFRP1 u posteljicama kod prijevremeno porođenog idiopatskog zastoja u rastu ploda (IUGR)

U skupini idiopatskog zastoja u rastu porođenih prije termina sakupili smo sedam posteljica. Klinički parametri roditelja te tjelesna težina i duljina rođene djece kao i težina posteljica prikazani su u Tablici 10 i 11.

Tablica 10. Klinički parametri majki i djece kod prijevremeno porođenog idiopatskog IUGR-a. Usporedba s kontrolnom skupinom terminskih posteljica.

	Kontrola (terminska) (n=25)	Prijevremeno porođeni idiopatski IUGR (n=7)	p vrijednost
Dob majke	28,8±0,87	32,29±3,71	0,4120
Paritet	1,56±0,15	1,42±0,4286	0,3788
Graviditet	1,64±0,16	2,28±0,42	0,7384
Tjelesna visina majke (cm)	168,2±0,94	163,0±2,13	0,0295
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	76,3±1,81	70,00±3,88	0,2364
Prirast tjelesne težine (kg)	16,16±0,85	13,43±2,26	0,1138
BMI	26,95±0,57	26,34±1,36	0,8521
BMI prije trudnoće	21,26±0,48	21,34±1,34	0,8152
OGTT 0'	4,39±0,08	4,42±0,2	0,8459
OGTT 60'	5,23±0,17	5,2±0,01	
OGTT 120'	5,63±0,31	4,73±0,36	0,1146
Trajanje gestacije	39 ^{+3/7} (raspon 38 ^{+1/7} - 41 ^{+2/7})	34 ^{+2/7} (raspon 32-36 ^{+5/7})	
Sistolički krvni tlak	117,8±1,83	126,4±3,57	0,0358
Dijastolički krvni tlak	74±1,16	78,57±3,4	0,2129
Tjelesna težina ploda (g)	3488±73	1653±85,57	p<0,0001
Tjelesna duljina ploda (cm)	50,84±0,24	42,29±0,64	p<0,0001
Masa posteljica (g)	613,2±40,68	254,3±24,67	p<0,0001
Fetoplacentarni omjer	6,19±0,38	6,89±0,77	0,5023
Spol djeteta			
Muško	14	5	
Žensko	11	2	
Način poroda			
Carski rez	2	7	
Vaginalni porod	23	0	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa (p<0,05) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Tablica 11. Klinički parametri majki i djece kod prijevremeno porođenog idiopatskog IUGR-a. Usporedba s kontrolnom skupinom prijevremenih poroda.

	Kontrolna skupina (prijevremeni porodi) (n=8)	Prijevremeno porođeni idiopatski IUGR (n=7)	p vrijednost
Dob majke	28±2,12	32,29±3,71	0,4821
Paritet	1,375±0,26	1,42±0,4286	>0,9999
Graviditet	1,75±0,25	2,28±0,42	0,9371
Tjelesna visina majke (cm)	167,4±1,93	163,0±2,13	0,1591
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	72,75±2,22	70,00±3,88	0,6315
Prirast tjelesne težine (kg)	11,38±0,68	13,43±2,26	0,8892
BMI	26,03±0,97	26,34±1,36	0,9319
BMI prije trudnoće	21,94±0,83	21,34±1,34	0,5534
OGTT 0'	4,51±0,24	4,42±0,2	0,8857
OGTT 60'	8,57±0,27	5,2±0,01	0,1714
OGTT 120'	5,56±0,44	4,73±0,36	0,1714
Trajanje gestacije	34 +2/7 (raspon 31-36 ^{+5/7})	34 ^{+2/7} (raspon 32-36 ^{+5/7})	
Sistolički krvni tlak	123,1±2,1	126,4±3,57	0,4255
Dijastolički krvni tlak	79,38±2,4	78,57±3,4	0,8741
Tjelesna težina ploda (g)	2583±293,4	1653±85,57	0,0047
Tjelesna duljina ploda (cm)	46,88±1,2	42,29±0,64	0,0075
Masa posteljica (g)	467,5±39,94	254,3±24,67	0,0005
Fetoplacentalni omjer	5,21±0,41	6,89±0,77	0,0939
Spol djeteta			
Muško	4	5	
Žensko	4	2	
Način poroda			
Carski rez	4	7	
Vaginalni porod	4	0	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa (p<0,05) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Tjelesna težina djece i duljina djece kao i masa posteljice statistički su značajno veće u terminskim kontrolnim trudnoćama u usporedbi s istim parametrima dobivenim kod prijevremeno porođenog idiopatskog IUGR-a (Mann Whitney test; p<0,05).

Statistički je značajno veća tjelesna visina majke u skupini kontrolnih terminskih posteljica te sistolički tlak majke (iako se prema kriterijima ne radi hipertenziji) u skupini trudnica koje su prije termina rodile djecu s idiopatskim IUGR.

Budući da se radi o prijevremenim porodima, skupina sa zastojem u rastu ploda uspoređena je sa skupinom prijevremeno rođene djece eutrofične za gestacijsku dob. U ispitivanoj skupini tjelesna težina, tjelesna duljina djece i masa posteljice statistički se značajno razlikuju u odnosu na kontrolnu skupinu prijevremeno rođene djece. Ostali klinički parametri ne pokazuju statistički značajnu razliku među tim dvjema skupinama.

Ekspresiju SFRP1 proteina analizirali smo u korionskim resicama. Statistički značajno izraženiju ekspresiju ovog antigena izmjerili smo u posteljicama kod prijevremeno porođenog idiopatskog IUGR-a u usporedbi s terminskim kontrolama (Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom; $p < 0,05$) (Tablica 12) i prikazali na Slici 9. Također smo usporedili cjelokupnu ekspresiju ovog proteina u obje skupine posteljica te dobili statistički značajno veću ekspresiju u patološkim uzorcima (Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom; $p < 0,05$) (Slika 10).

Tablica 12. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (Vv, mm⁰) u posteljicama kod prijevremeno porođenog idiopatskog IUGR-a i terminskim kontrolama.

Volumenska gustoća (Vv; mm ⁰)	Kontrola (terminska)	Prijevremeni idiopatski IUGR	p vrijednost
Korionske resice	0.1408±0.006168	0.1796±0.007750	0,0209
Ukupna ekspresija	0.1506±0.004358	0.1869±0.008267	0,0101

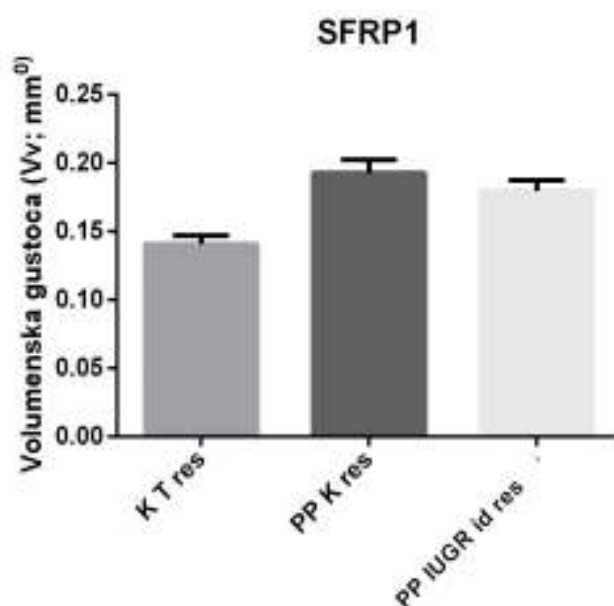
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

U usporedbi s prijevremeno porođenim kontrolama nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji SFRP1 antigena niti ukupno niti zasebno u korionskim resicama između obje skupina.

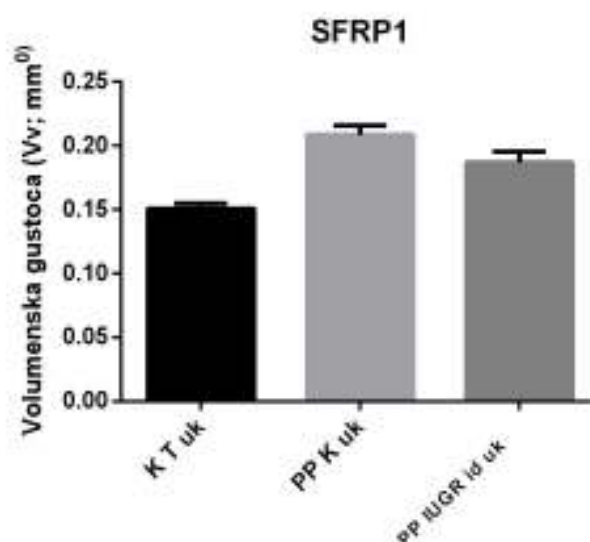
Tablica 13. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (Vv, mm⁰) u posteljicama kod prijevremeno porođenog idiopatskog IUGR-a i prijevremenim kontrolama.

Volumenska gustoća (Vv; mm ⁰)	Kontrola (prijevremena)	Prijevremeni idiopatski IUGR	p vrijednost
Korionske resice	0.1926±0.009558	0,1796±0.007750	ns
Ukupna ekspresija	0.2085±0.007196	0.1869±0.008267	0,5516

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = $> 0,9999$, nesignifikantno)

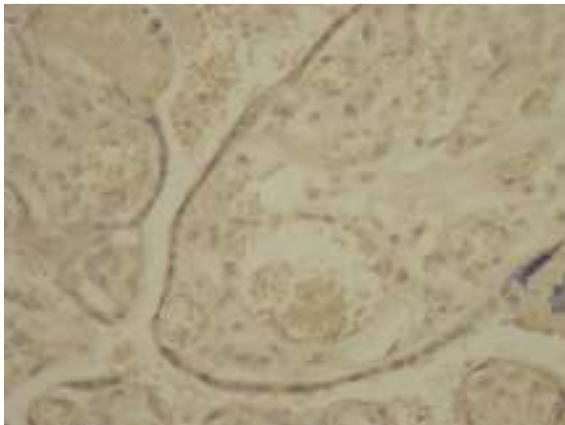


Slika 9. Ekspresija proteina SFRP1 u korionskim resicama terminskih kontrolnih posteljica (K T res), prijevremeno porođenih kontrolnih posteljica (PP K res) te prijevremeno porođenih posteljica iz trudnoća s idiopatskim zastojem u rastu ploda (PP IUGR id res).



Slika 10. Ukupna ekspresija proteina SFRP1 u terminskim kontrolnim posteljicama (K T uk), prijevremeno porođenim kontrolnim posteljicama (PP K uk) te prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s idiopatskim zastojem u rastu ploda (PP IUGR id uk).

Ekspresija proteina SFRP1 bila je izražena je u citoplazmi decidualnih stanica te u korionskim resicama (Slika 11), u citoplazmi viloznog sinciotrofoblasta, citotrofoblasta i ekstraviloznih intermedijarnih trofoblasta.



Slika 11. Ekspresija proteina SFRP1 u posteljici kod prijevremenog poroda uz IUGR

5.1.5. Ekspresija proteina SFRP1 u terminskim posteljicama kod zastoja u rastu ploda uz povišeni krvni tlak majke

U skupini s intrauterinim zastojem u rastu uz povišeni krvni tlak majke sakupili smo pet posteljica. Klinički parametri roditelja te tjelesna težina i duljina rođene djece kao i težina posteljica prikazani su u Tablici 14.

Tablica 14. Klinički parametri kod majki i djece kod IUGR-a uz povišeni krvni tlak majke

	Kontrola (terminska) (n=25)	IUGR/RR (terminski) (n=5)	p vrijednost
Dob majke	28,8±0,87	31,5±2,99	0,3808
Paritet	1,538±	1,25±0,25	0,5469
Graviditet	1,615±	1,25±0,25	0,5362
Tjelesna visina majke (cm)	168,2±0,94	164,8±1,84	0,1605
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	76,3±1,81	79,25±5,15	0,6576
Prirast tjelesne težine (kg)	16,16±0,85	12,5±2,9	0,2669
BMI	26,95±0,57	29,1±1,28	0,2236
BMI prije trudnoće	21,26±0,48	24,53±1,53	0,0530
OGTT 0'	4,39±0,08	4,32±0,35	0,8481
OGTT 60'	5,23±0,17	-	-
OGTT 120'	5,63±0,31	7,24±0,87	0,1165
Trajanje gestacije	39+3/7 (raspon 38 ^{+1/7} -41 ^{+2/7})	38 (raspon 37 ^{+5/7} -38 ^{+3/7})	
Sistolički krvni tlak	117,8±1,83	167,5±4,79	p<0,0001
Dijastolički krvni tlak	74±1,16	106,3±10,68	0,0004
Tjelesna težina ploda (g)	3488±73	2393±37,05	p<0,001
Tjelesna dužina ploda (cm)	50,84±0,24	47,7±0,63	0,0017
Masa posteljica (g)	613,2±40,68	407,5±12,5	p<0,001
Fetoplacentarni omjer	6,19±0,38	5,88±0,16	0,6984
Spol djeteta			
Muško	14	2	
Žensko	11	3	
Način poroda			
Carski rez	2	4	
Vaginalni porod	23	1	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa (p<0,05) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

U patološkim trudnoćama zabilježili smo statistički značajno povećanje sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka u odnosu na kontrolu (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Djeca su bila statistički manje težine i duljine kao i manje mase posteljica u odnosu na kontrolu (Mann Whitney test; $p < 0,05$).

U ostalim kliničkim parametrima nije bilo statistički značajne razike među trudnicama ispitivanih skupina.

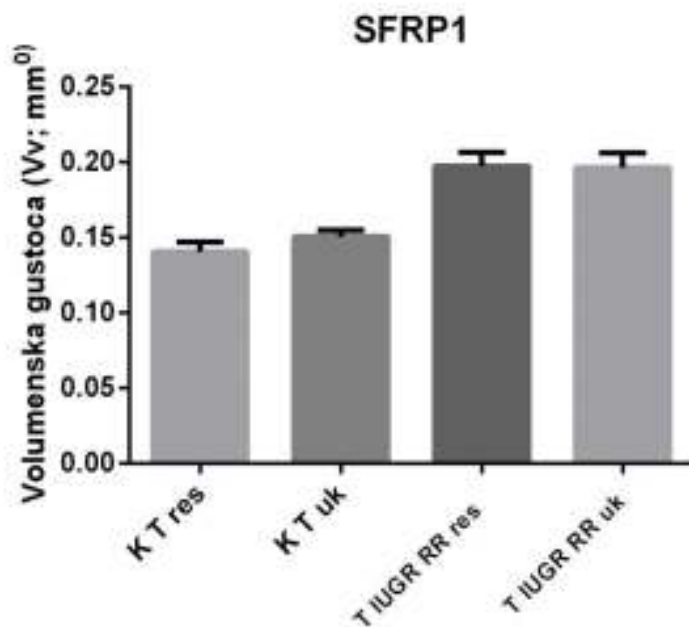
Analizirali smo ukupnu ekspresiju SFRP1 proteina u posteljicama iz trudnoća sa zastojem rastu uz povišeni tlak te zasebnu u korionskim resicama tih posteljica. Statistički značajno izraženiju ekspresiju ovog antigena izmjerili smo u korionskim resicama patoloških posteljica u usporedbi s terminskim kontrolama (tablica 15).

Tablica 15. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v , mm^0) u posteljicama kod terminskog IUGR-a uz povišeni krvni tlak majke (IUGR/RR) te terminskim kontrolama.

Volumenska gustoća (V_v ; mm^0)	Kontrola (terminska)	Terminski IUGR/RR	p vrijednost
Korionske resice	0.1408 ± 0.006168	0.1976 ± 0.009316	0,0258
Cijela posteljica	0.1506 ± 0.004358	0.1965 ± 0.009563	0,0907

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom i prikazali na Slici 12. U obje vrste uzoraka dobili smo veću ekspresiju SFRP1 proteina u patološkim posteljicama nego u kontrolnim no razlika je bila statistički značajna samo u korionskim resicama. (Kruskal Wallis ANOVA $p < 0,05$).



Slika 12. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v , mm^0) u korionskim resicama te ukupna ekspresija u posteljicama kod terminskog zastoja u rastu ploda uz povišeni krvni tlak majke i u terminskim kontrolama.

(KT res = terminska kontrola resice; KT uk= terminska kontrola ukupno; T IUGR RR res= terminski IUGR s povišenim tlakom resice; T IUGR RR uk = terminski IUGR s povišenim tlakom ukupno)

5.1.6. Ekspresija proteina SFRP1 u posteljicama kod prijevremenog poroda uz zastoje u rastu ploda i povišeni krvni tlak majke

U skupini prijevremenog poroda uz IUGR i povišeni krvni tlak majke sakupili smo devet posteljica. Klinički parametri roditelja, te tjelesna težina i duljina rođene djece kao i težina posteljica prikazani su u Tablici 16 i 17..

Tablica 16. Klinički parametri majki i djece kod prijevremenih poroda uz IUGR i povišen krvni tlak u usporedbi s terminskim kontrolama

	Kontrola (terminska) (n=25)	Prijevremeni porod/IUGR/RR (n=9)	p vrijednost
Dob majke	28,8±0,87	29,33±1,65	0,6642
Paritet	1,538	1,11±0,11	0,1491
Graviditet	1,615	1,33±0,24	0,2349
Tjelesna visina majke (cm)	168,2±0,94	163,3±1,33	0,0058
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	76,3±1,81	81±4,42	0,4585
Prirast tjelesne težine (kg)	16,16±0,85	9,67±0,85	p< 0,0001
BMI	26,95±0,57	30,37±1,57	0,0612
BMI prije trudnoće	21,26±0,48	26,69±1,51	0,0009
OGTT 0'	4,39±0,08	4,5±0,16	0,5810
OGTT 60'	5,23±0,17	4,45±0,05	0,2000
OGTT 120'	5,63±0,31	6,0±0,44	0,8349
Trajanje gestacije	39+3/7 (raspon 38 ^{+1/7} -41 ^{+2/7})	34 +3/7 (raspon 30 ^{+2/7} -36 ^{+6/7})	
Sistolički krvni tlak	117,8±1,83	177,8±6,83	p< 0,0001
Dijastolički krvni tlak	74±1,16	112,8±4,18	p< 0,0001
Tjelesna težina ploda (g)	3488±73	1726±183	p< 0,0001
Tjelesna visina ploda (cm)	50,84±0,24	42±1,68	p< 0,0001
Masa posteljica (g)	613,2±40,68	305,6±29,91	p< 0,0001
Fetoplacentalni omjer	6,19±0,38	5,66±0,38	0,2386
Spol djeteta			
Muško	14	6	
Žensko	11	3	
Način poroda			
Carski rez	2	9	
Vaginalni porod	23	0	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa (p<0,05) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Tjelesna težina i duljina djece te masa posteljica statistički su značajno veće u kontrolnim terminskim trudnoćama u usporedbi s istim parametrima dobivenim kod

prijevremenog IUGR-a uz povišen krvni tlak (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Sistolički i dijastolički krvni tlak bili su statistički značajno veći u patološkim trudnoćama u odnosu na kontrolne zdrave (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Statistički se značajno razlikuju i visina i prirast tjelesne težine majki (Mann Whitney test; $p < 0,05$).

Tablica 17. Klinički parametri majki i djece kod prijevremenih poroda uz IUGR i povišeni krvni tlak u usporedbi s kontrolnom skupinom prijevremeno rođene djece

	Kontrolna skupina (prijevremeni porodi) (N=8)	Prijevremeni porod/IUGR/RR (n=9)	p vrijednost
Dob majke	28 ±02,12	29,33±1,65	0,4976
Paritet	1,375±0,26	1,11±0,11	0,4529
Graviditet	1,75±0,25	1,33±0,24	0,2349
Tjelesna visina majke (cm)	167,4±1,93	163,3±1,33	0,1323
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	72,75±2,22	81±4,42	0,3314
Prirast tjelesne težine (kg)	11,38±0,68	9,67±0,85	0,2068
BMI	26,03±0,97	30,37±1,57	0,0439
BMI prije trudnoće	21,94±0,83	26,69±1,51	0,0194
OGTT 0'	4,51±0,24	4,5±0,16	0,8571
OGTT 60'	8,567±0,27	4,45±0,05	0,1000
OGTT 120'	5,56±0,44	6,0±0,44	0,8571
Trajanje gestacije	34 +2/7 (raspon 31-36 ^{+5/7})	34 +3/7 (raspon 30 ^{+2/7} - 36 ^{+6/7})	
Sistolički krvni tlak	123,1±2,1	177,8±6,83	p < 0,0001
Dijastolički krvni tlak	79±2,4	112,8±4,18	p < 0,0001
Tjelesna težina ploda (g)	2583±293,4	1726±183	0,0360
Tjelesna visina ploda (cm)	46,88±1,2	42±1,68	0,0697
Masa posteljica (g)	467,5±39,94	305,6±29,91	0,0034
Fetoplacentalni omjer	5,21±0,41	5,66±0,38	0,3623
Spol djeteta			
Muško	4	6	
Žensko	4	3	
Način poroda			
Carski rez	4	9	
Vaginalni porod	4	0	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Tjelesna težina djece te masa posteljica statistički su značajno veće u kontrolnim prijevremeno porođenim trudnoćama u usporedbi s istim parametrima dobivenim kod prijevremenog IUGR-a uz povišen krvni tlak majke (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Tjelesna

duljina ploda nije statistički značajno različita, vjerojatno jer se radi o asimetričnom zastoju u rastu. Sistolički i dijastolički krvni tlak bili su statistički značajno veći u patološkim trudnoćama u odnosu na kontrolne zdrave trudnice. (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Također su trudnice u skupini s povišenim tlakom i IUGR imale statistički značajno veći indeks tjelesne mase (BMI) na porodu i prije trudnoće (Mann Whitney test; $p < 0,05$).

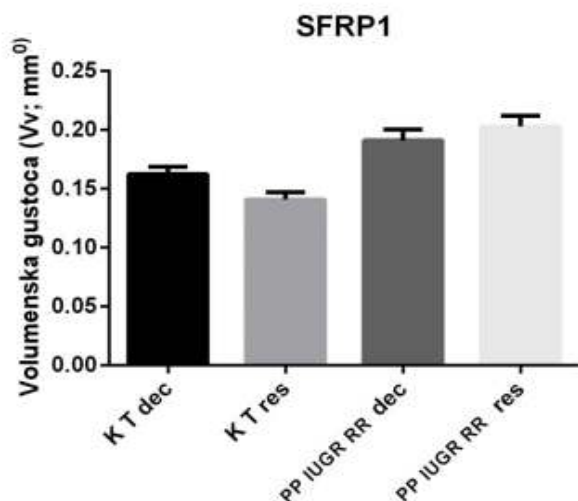
Ekspresiju SFRP1 proteina u decidui i u korionskim resicama prijevremeno porođenih posteljica s IUGR i povišenim tlakom usporedili smo s kontrolnom skupinom terminskih posteljica. Statistički značajno izraženiju ekspresiju ovog antigena izmjerili smo u posteljicama kod prijevremeno porođenih IUGR-a s tlakom u usporedbi s terminskim kontrolama kako u decidui tako i u korionskim resicama (Tablica 18).

Tablica 18. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v , mm^0) u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s IUGR i povišenim tlakom te u terminskim kontrolama.

Volumenska gustoća (V_v ; mm^0)	Kontrola (terminska)	Prijevremeni IUGR uz povišeni tlak	p vrijednost
Decidua	0.1625 ± 0.005954	0.1908 ± 0.009464	0,0233
Korionske resice	0.1408 ± 0.006168	0.2029 ± 0.009017	0,0001
Cijela posteljica	0.1506 ± 0.004358	0.1935 ± 0.007116	0,0010

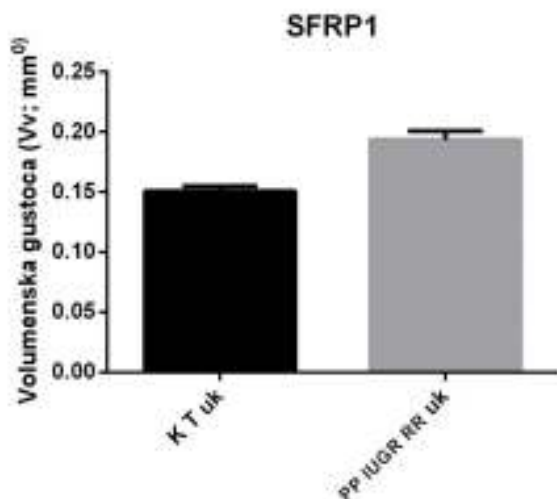
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Navedene rezultate smo prikazali na Slici 13. Također smo usporedili cjelokupnu ekspresiju ovog proteina u obje vrste posteljica te dobili statistički značajno veću ekspresiju u patološkim uzorcima (Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom; $p < 0,05$) (Slika 14).



Slika 13. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (Vv, mm⁰) u decidui i korionskim resicama posteljica iz prijevremenih poroda kompliciranih IUGR-om i povišenim krvnim tlakom majke te u terminskim kontrolama. (KT dec = terminska kontrola decidua; KT res = terminska kontrola resice; PP IUGR RR dec= prijevremeno porođeni IUGR s povišenim tlakom decidua; PP IUGR RR res = prijevremeno porođeni IUGR s povišenim tlakom resice)

Također smo usporedili cjelokupnu ekspresiju ovog proteina u obje skupine posteljica te dobili statistički značajno veću ekspresiju u patološkim uzorcima (Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom; $p < 0,05$). Dobivene rezultate prikazali smo na Slici 14.



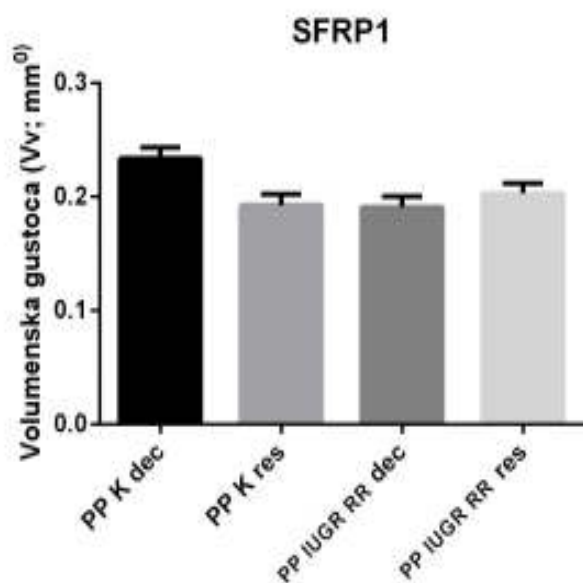
Slika 14. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP1 antigena (Vv, mm⁰) u posteljicama iz prijevremenih poroda kompliciranih IUGR-om i povišenim krvnim tlakom (PP IUGR RR uk) te u terminskim kontrolama (KT uk).

Ekspresiju SFRP1 proteina u decidui i u korionskim resicama prijevremeno porođenih posteljica s IUGR i povišenim tlakom usporedili smo s kontrolnom skupinom prijevremeno porođenih posteljica. U decidui, korionskim resicama niti u ukupnoj ekspresiji antigena u cijeloj patološkoj posteljici nije bilo statistički značajne razlike među ispitivanim skupinama (Tablica 19). Dobivene rezultate prikazali smo na Slici 15 i Slici 16.

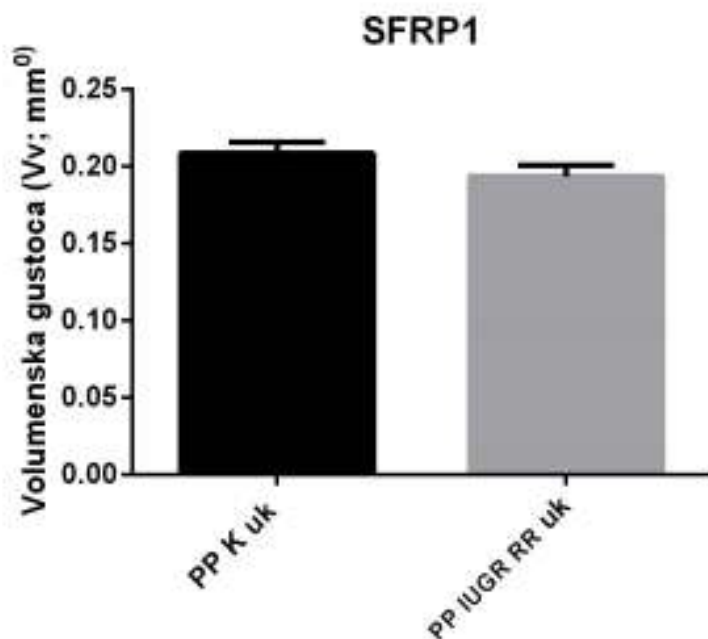
Tablica 19. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s IUGR i povišenim tlakom te u prijevremenim kontrolama.

Volumenska gustoća ($V_v; \text{mm}^0$)	Kontrola (prijevremena)	Prijevremeni IUGR uz povišeni tlak	p vrijednost
Decidua	0.2336 ± 0.009750	0.1908 ± 0.009464	0,1016
Korionske resice	0.1926 ± 0.009558	0.2029 ± 0.009017	ns
Cijela posteljica	0.2085 ± 0.007196	0.1935 ± 0.007116	ns

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = $> 0,9999$, nesigifikantno)

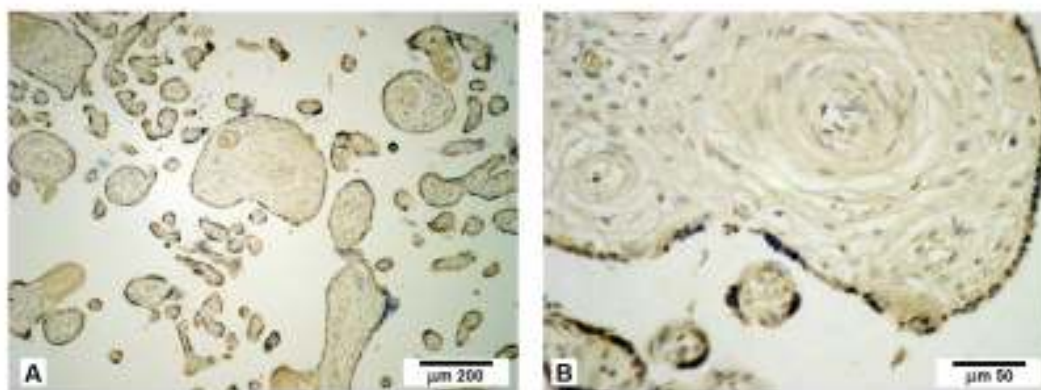


Slika 15. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u decidui i korionskim resicama posteljica iz prijevremenih poroda kompliciranih IUGR-om i povišenim krvnim tlakom te u prijevremenim kontrolama (PP K dec = prijevremena kontrola decidua; PP K res = prijevremena kontrola resice; PP IUGR RR dec= prijevremeno porođeni IUGR s povišenim tlakom decidua; PP IUGR RR res = prijevremeno porođeni IUGR s povišenim tlakom resice)



Slika 16. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP1 antigena (Vv, mm⁰) u posteljicama iz prijevremenih poroda kompliciranih IUGR-om i povišenim krvnim tlakom (PP IUGR RR uk) te u prijevremenim kontrolama (PP K uk)

Ekspresija proteina SFRP1 bila je izražena je u citoplazmi decidualnih stanica te u korionskim resicama (Slika 17), u citoplazmi viloznog sinciciotrofoblasta i citotrofoblasta.



Slika 17. Ekspresija proteina SFRP1 u posteljicama kod prijevremenih poroda uz IUGR i povišen krvni tlak (DAB, kontrastirano hemalaunom)

5.1.7. Ekspresija proteina SFRP1 u terminskim posteljicama kod povišenog krvnog tlaka majke bez zastoja u rastu ploda (djeca eutrofična za dob, spol i paritet majke)

U terminskoj skupini s povišenim krvnim tlakom, a bez zastoja u rastu ploda sakupili smo devet posteljica. Klinički parametri roditelja te tjelesna težina i duljina rođene djece kao i težina posteljica prikazani su u Tablici 20.

Tablica 20. Klinički parametri majki i djece kod povišenog krvnog tlaka majke i eutrofične djece rođene u terminu

	Kontrola (terminska) (n=25)	RR/ eutrofični (terminski) (n=9)	p vrijednost
Dob majke	28,8±0,87	32,33±1,69	0,0758
Paritet	1,560±0,1536	1,667±0,44	0,7928
Graviditet	1,640±0,1621	1,778±0,55	0,6472
Tjelesna visina majke (cm)	168,2±0,94	169,8±2,40	0,8523
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	76,3±1,81	106,2±3,69	< 0,0001
Prirast tjelesne težine (kg)	16,16±0,85	14,00±1,91	0,4102
BMI	26,95±0,57	36,92±1,42	p< 0,0001
BMI prije trudnoće	21,26±0,48	32,02±1,45	p< 0,0001
OGTT 0'	4,39±0,08	4,94±0,14	0,0044
OGTT 60'	5,23±0,17	8,66± 0,75	0,0357
OGTT 120'	5,63±0,31	7,29±0,60	0,0452
Trajanje gestacije	39+3/7 (raspon 38 ^{+1/7} -41 ^{+2/7})	38 +2/7 (raspon 37 ^{+1/7} -40 ^{+1/7})	0,0649
Sistolički krvni tlak	117,8±1,83	157,2±3,02	p< 0,0001
Dijastolički krvni tlak	74±1,16	106,1±2,32	p< 0,0001
Tjelesna težina ploda (g)	3488±73	3220±54,34	0,0166
Tjelesna duljina ploda (cm)	50,84±0,24	50,00±0,62	0,3002
Masa posteljica (g)	613,2±40,68	482,5±32,50	0,0321
Fetoplacentalni omjer	6,19±0,38	6,82±0,48	0,4443
Spol djeteta			
Muško	14	5	
Žensko	11	4	
Način poroda			
Carski rez	2	6	
Vaginalni porod	23	3	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa (p<0,05) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

U patološkim trudnoćama zabilježili smo statistički značajno povećanje sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka u odnosu na kontrolu (Mann Whitney test; p<0,05). Djeca su bila

statistički manje težine kao i mase posteljica u odnosu na kontrolu (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Majke s patološkom trudnoćom imale su statistički značajno već tjelesnu težinu i BMI na porodu, kao i BMI prije trudnoće u odnosu na kontrolnu skupinu trudnica. Također je u skupini s patološkom trudnoćom statistički značajna razlika u OGTT testu na tašte te nakon 60 i 120 min u odnosu na kontrolu iako se prema HAPO studiji (*engl. Hyperglycemia and adverse perinatal outcome*) (225) ne ubrajaju u gestacijski dijabetes (Mann Whitney test; $p < 0,05$).

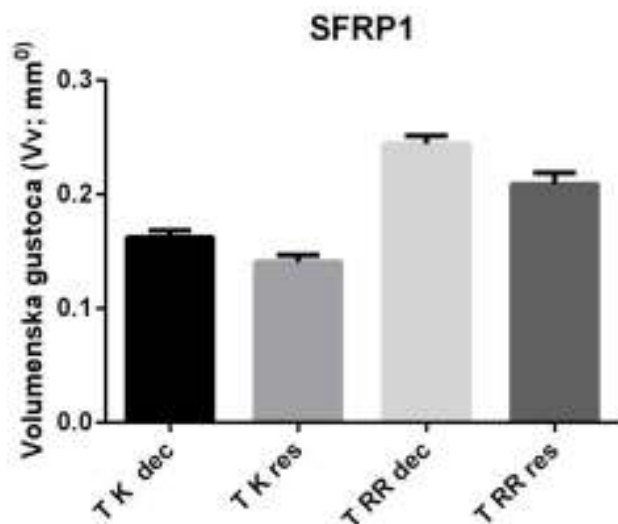
Ekspresiju SFRP1 proteina analizirali smo zasebno u decidui i u korionskim resicama. Statistički značajno izraženiju ekspresiju ovog antigena izmjerili smo u posteljicama kod povišenog krvnog tlaka majke uz eutrofičnu djecu u usporedbi s kontrolama kako u decidui tako i u korionskim resicama (Tablica 21). Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom i prikazali na Slikama 18 i 19.

Tablica 21. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u terminskim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom i eutrofičnom djecom te kontrolama.

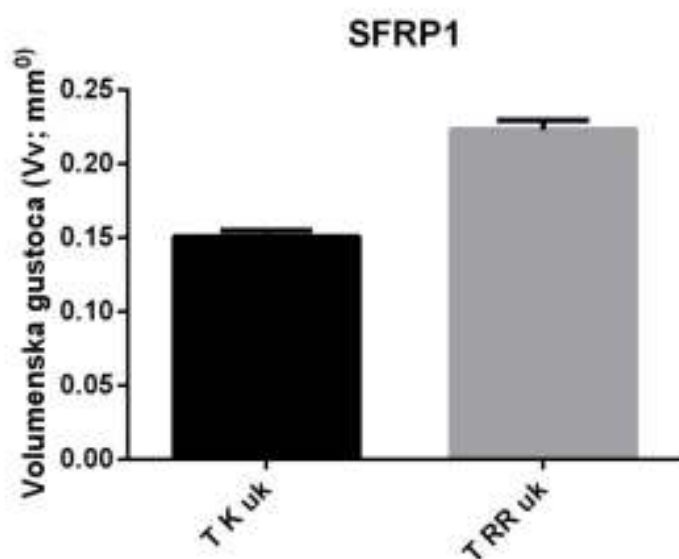
Volumenska gustoća (V_v, mm^0)	Kontrola (terminska)	RR bez IUGR (terminski)	p vrijednost
Decidua	0.1625±0.005954	0,2443±0.007069	< 0,0001
Korionske resice	0.1408±0.006168	0.2091±0.009731	< 0,0001
Cijela posteljica	0.1506±0.004358	0.2232±0.006622	< 0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Također smo usporedili cjelokupnu ekspresiju ovog proteina u obje vrste posteljica te dobili statistički značajno veću ekspresiju u patološkim uzorcima (Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom; $p < 0,05$).

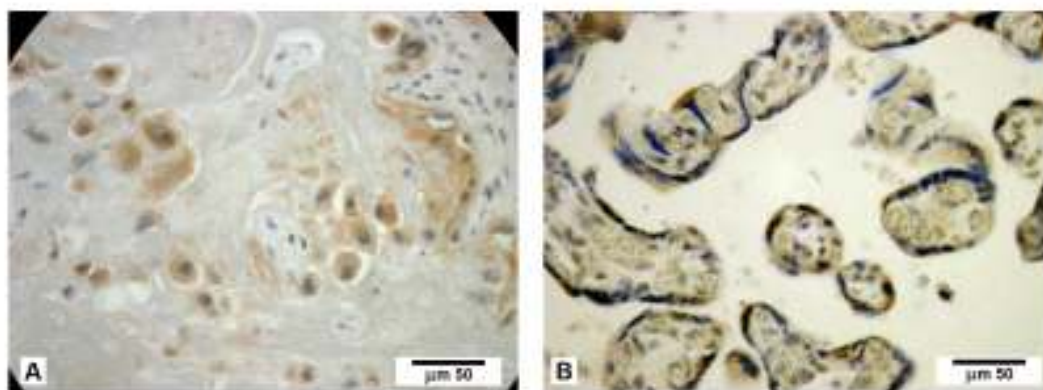


Slika 18. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u decidui i korionskim resicama terminskih posteljica iz trudnoća s povišenim krvnim tlakom majke i eutrofičnom djecom te u terminskim kontrolama. (TK dec = terminske konrole decidua; TK res = terminske kontrole resice; T RR dec = terminski povišeni tlak decidua; T RR res= terminski povišeni tlak resice)



Slika 19. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u posteljicama iz trudnoća s povišenim krvnim tlakom majke i eutrofičnom djecom (T RR uk) te u terminskim kontrolama (T K uk).

Ekspresiju proteina SFRP1 našli smo u citoplazmi viloznog sinciciotrofoblasta, citotrofoblasta i ekstraviloznih intermedijarnih trofoblasta te u citoplazmi stanica decidue (slika 20).



Slika 20. Ekspresija proteina SFRP1 u decidui (A) i korionskim resicama (B) u terminskim posteljicama s povišenim krvnim tlakom bez zastoja u rastu. (DAB, kontrastirano hemalaunom)

5.1.8. Ekspresija proteina SFRP1 u prijevremeno porođenim posteljicama kod povišenog krvnog tlaka majke bez zastoja u rastu ploda (djeca eutrofična za gestacijsku dob, spol i paritet majke)

U skupini prijevremeno rođene djece eutrofične za gestacijsku dob, spol i paritet majke iz trudnoća s povišenim krvnim tlakom majke, sakupili smo pet posteljica. Klinički parametri roditelja te tjelesna težina i duljina rođene djece kao i težina posteljica prikazani su u Tablici 22 i 23.

Tablica 22. Klinički parametri majki i djece kod povišenog krvnog tlaka majke i eutrofične prijevremeno rođene djece – usporedba s terminskom kontrolnom skupinom

	Kontrola (terminska) (n=25)	RR/ eutrofični (prijevremeni) (n=5)	p vrijednost
Dob majke	28,8±0,87	35,40±2,36	0,0074
Paritet	1,560±0,1536	1,8±0,37	0,5744
Graviditet	1,640±0,1621	2,2±0,37	0,2134
Tjelesna visina majke (cm)	168,2±0,94	163,4±2,11	0,0524
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	76,3±1,81	83,2±7,64	0,5067
Prirast tjelesne težine (kg)	16,16±0,85	10,8±1,71	0,0193
BMI	26,95±0,57	31,2±2,91	0,139
BMI prije trudnoće	21,26±0,48	27,1±2,85	0,0048
OGTT 0'	4,39±0,08	4,74±0,19	0,0057
OGTT 60'	5,23±0,17	-	-
OGTT 120'	5,63±0,31	7,35±0,62	0,0487
Trajanje gestacije	39+3/7 (raspon 38 ^{+1/7} -41 ^{+2/7})	34+4/7 (raspon 31 ^{+3/7} -36 ^{+5/7})	p<0,0001
Sistolički krvni tlak	117,8±1,83	170±14,83	p< 0,0001
Dijastolički krvni tlak	74±1,16	116±8,12	p< 0,0001
Tjelesna težina ploda (g)	3488±73	2522±337,7	0,0056
Tjelesna duljina ploda (cm)	50,84±0,24	46,00±2,45	0,0109
Masa posteljica (g)	613,2±40,68	512,0±63,91	0,4217
Fetoplacentalni omjer	6,19±0,38	4,95±0,36	0,0789
Spol djeteta			
Muško	14	5	
Žensko	11	0	
Način poroda			
Carski rez	2	4	
Vaginalni porod	23	1	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa (p<0,05) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

U patološkim prijevremeno porođenim trudnoćama zabilježili smo statistički značajno povećanje sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka u odnosu na kontrolu (Mann Whitney test; $p<0,05$). Djeca su bila statistički manje težine i duljine u odnosu na terminsku kontrolu (Mann Whitney test; $p<0,05$), kao rezultat razlike u gestacijskoj dobi koja je također statistički značajna. Majke s patološkom trudnoćom imale su statistički značajno veći prirast tjelesne težine i BMI na porodu, te stariju životnu dob u odnosu na kontrolnu skupinu trudnica. Također je u skupini s patološkom trudnoćom statistički značajna razlika u OGTT testu na tašte te nakon 120 min u odnosu na kontrolu iako se prema HAPO studiji ne ubrajaju u gestacijski dijabetes (Mann Whitney test; $p<0,05$).

Tablica 23. Klinički parametri majki i djece kod povišenog krvnog tlaka majke i eutrofične prijevremeno rođene djece – usporedba s kontrolnom skupinom prijevremenih poroda

	Kontrola (prijevremena) (n=8)	RR/ eutrofični (prijevremeni) (n=5)	p vrijednost
Dob majke	28 ±02,12	35,40±2,36	0,0373
Paritet	1,375±0,26	1,8±0,37	0,4343
Graviditet	1,75±0,25	2,2±0,37	0,4545
Tjelesna visina majke (cm)	167,4±1,93	163,4±2,11	0,3030
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	72,75±2,22	83,2±7,64	0,2020
Prirast tjelesne težine (kg)	11,38±0,68	10,8±1,71	0,9169
BMI	26,03±0,97	31,2±2,91	0,0435
BMI prije trudnoće	21,94±0,83	27,1±2,85	0,0598
OGTT 0'	4,51±0,24	4,74±0,19	0,021
OGTT 60'	8,567±0,27	-	-
OGTT 120'	5,56±0,44	7,35±0,62	0,041
Trajanje gestacije	34 +2/7 (raspon 31-36 ^{+5/7})	34+ 4/7 (raspon 31 ^{+3/7} -36 ^{+5/7})	0,4988
Sistolički krvni tlak	123,1±2,1	170±14,83	0,0016
Dijastolički krvni tlak	79±2,4	116±8,12	0,0008
Tjelesna težina ploda (g)	2583±293,4	2522±337,7	>0,9999
Tjelesna duljina ploda (cm)	46,88±1,2	46,00±2,45	0,8355
Masa posteljica (g)	467,5±39,94	512,0±63,91	0,8648
Fetoplacentalni omjer	5,21±0,41	4,95±0,36	>0,9999
Spol djeteta			
Muško	4	5	
Žensko	4	0	
Način poroda			
Carski rez	4	4	
Vaginalni porod	4	1	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa ($p<0,05$) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

U patološkim prijevremeno porođenim trudnoćama zabilježili smo statistički značajno povećanje sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka u odnosu na prijevremenu kontrolnu skupinu (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Djeca nisu bila manje težine niti duljine u odnosu na prijevremenu kontrolu (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Majke s patološkom trudnoćom imale su statistički značajno veći BMI na porodu, te stariju životnu dob u odnosu na kontrolnu skupinu trudnica. Također je u skupini s patološkom trudnoćom statistički značajna razlika u OGTT testu na tašte te nakon 120 min u odnosu na kontrolu iako se prema HAPO studiji ne ubrajaju u gestacijski dijabetes (Mann Whitney test; $p < 0,05$)

Ekspresiju SFRP1 proteina analizirali smo zasebno u decidui i u korionskim resicama. Statistički značajno izraženiju ekspresiju ovog antigena izmjerili smo u prijevremeno porođenim posteljicama kod povišenog krvnog tlaka uz eutrofičnu djecu u usporedbi s terminskim kontrolama kako u decidui tako i u korionskim resicama (Tablica 24). Također smo analizirali ukupnu ekspresiju SFRP 1 u posteljici i našli statistički značajno veću ekspresiju u patološkim posteljicama (tablica 24). Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom i prikazali na Slikama 21 i 22. Uspoređujući s kontrolnom skupinom prijevremenih poroda, razlike nije bilo niti u decidui, niti u korionskim resicama, ni u ukupnoj ekspresiji antigena u posteljici. Rezultati su prikazani u Tablici 25 te na Slikama 21 i 22.

Tablica 24. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom i eutrofičnom djecom (RR) te terminskim kontrolama.

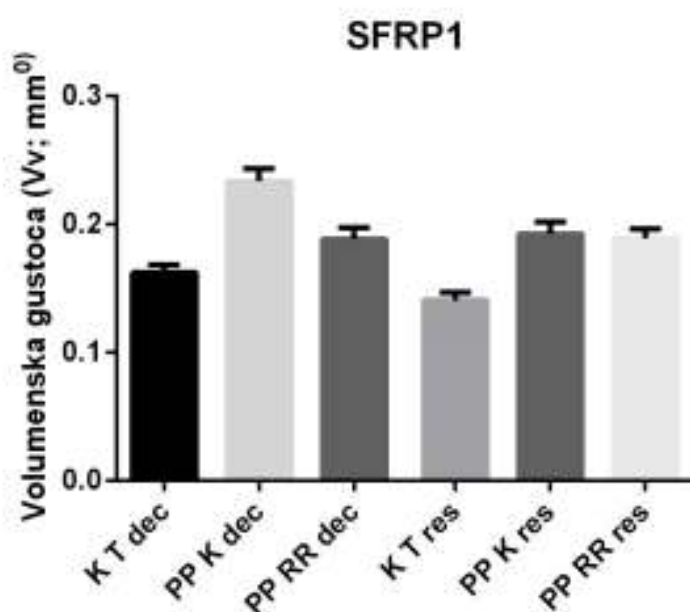
Volumenska gustoća (V_v, mm^0)	Kontrola (terminska)	RR (prijevremeni)	p vrijednost
Decidua	0.1625 ± 0.005954	0.1887 ± 0.008889	0,0372
Korionske resice	0.1408 ± 0.006168	0.1891 ± 0.007462	0,0001
Cijela posteljica	0.1506 ± 0.004358	0.1995 ± 0.006622	< 0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

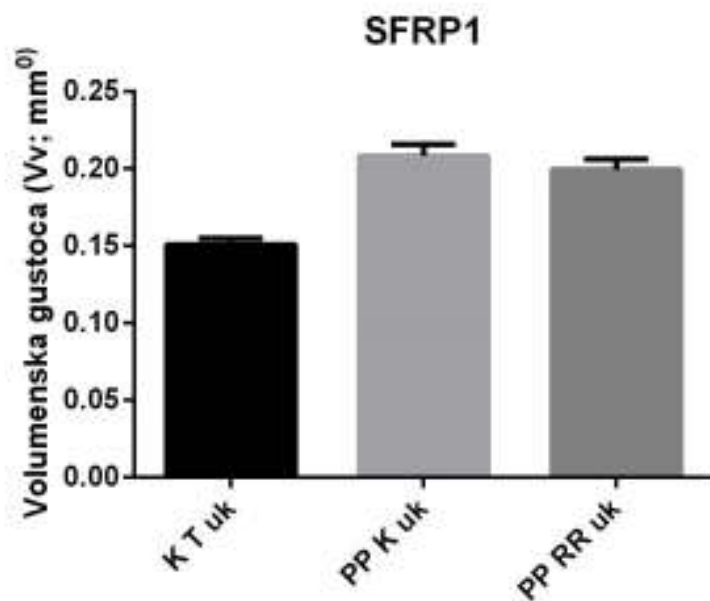
Tablica 25. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v , mm^0) u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom i eutrofičnom djecom (RR) te prijevremenim kontrolama.

Volumenska gustoća (V_v ; mm^0)	Kontrola (prijevremena)	RR (prijevremeni)	p vrijednost
Decidua	0.2336 ± 0.009750	0.1887 ± 0.008889	0,1668
Korionske resice	0.1926 ± 0.009558	0.1891 ± 0.007462	ns
Cijela posteljica	0.2085 ± 0.007196	0.1995 ± 0.006622	ns

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = $> 0,9999$, nesigifikantno)



Slika 21. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v , mm^0) u decidui i korionskim resicama prijevremeno porođenih posteljica iz trudnoća s povišenim krvnim tlakom majke i eutrofičnom djecom te u terminskim i prijevremenim kontrolama. (TK dec = terminske konrole decidua; TK res = terminske kontrole resice; PP RR dec = prijevremeno porođeni povišeni tlak decidua; PP RR res= prijevremeno porođeni povišeni tlak resice; PP K dec= prijevremena kontrola decidua; PP K res= prijevremena kontrola resice)



Slika 22. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP1 antigena (Vv, mm⁰) u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim krvnim tlakom i eutrofičnom djecom (PP RR uk) te u terminskim (KT uk) i prijevremenim kontrolama (PP K uk).

5.1.9. Ekspresija proteina SFRP1 u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća kompliciranih s gestacijskim dijabetesom

U skupini prijevremenih poroda trudnoća kompliciranih gestacijskim dijabetesom sakupili smo sedam prijevremeno porođenih posteljica. Klinički parametri roditelja te tjelesna težina i duljina rođene djece kao i težina posteljica prikazani su u Tablici 26.

Tablica 26. Klinički parametri majki i djece iz prijevremeno porođenih trudnoća kompliciranih s gestacijskim dijabetesom– usporedba s terminskom kontrolnom skupinom

	Kontrola (terminska) (n=25)	Gestacijski dijabetes (prijevremeni) (n=7)	p vrijednost
Dob majke	28,8±0,87	28,71±1,3	0,8310
Paritet	1,560±0,1536	1,8±0,37	0,8342
Graviditet	1,640±0,1621	1,429±0,20	0,6985
Tjelesna visina majke (cm)	168,2±0,94	1,429±0,20	0,2734
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	76,3±1,81	72,43±3,74	0,4007
Prirast tjelesne težine (kg)	16,16±0,85	10,14±0,8	0,0001
BMI	26,95±0,57	26,80±1,31	0,7295
BMI prije trudnoće	21,26±0,48	23,01±1,24	0,2107
OGTT 0'	4,39±0,08	5,37±0,33	0,0017
OGTT 60'	5,23±0,17	10,32±0,55	0,0357
OGTT 120'	5,63±0,31	9,03±0,94	0,0004
Trajanje gestacije	39+3/7 (raspon 38 ^{+1/7} -41 ^{+2/7})	34+4/7 (raspon 33 ^{+2/7} -36 ^{+5/7})	p<0,0001
Sistolički krvni tlak	117,8±1,83	120,0±4,36	0,7271
Dijastolički krvni tlak	74±1,16	75,71±3,69	0,6062
Tjelesna težina ploda (g)	3488±73	2670±174,0	0,0001
Tjelesna duljina ploda (cm)	50,84±0,24	47,86±0,8	0,0028
Masa posteljica (g)	613,2±40,68	504,3±52,371	0,2452
Fetoplacentalni omjer	6,19±0,38	5,56±0,57	0,2690
Spol djeteta			
Muško	14	4	
Žensko	11	3	
Način poroda			
Carski rez	2	1	
Vaginalni porod	23	6	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa (p<0,05) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

U patološkim prijevremeno porođenim trudnoćama zabilježili smo statistički značajno veće vrijednosti glukoze u krvi (GUK) u OGTT testu natašte, nakon 60 i nakon 120 min u odnosu na kontrolnu terminsku skupinu (Mann Whitney test; p<0,05). Djeca su bila statistički

manje težine i duljine u odnosu na terminsku kontrolu (Mann Whitney test; $p < 0,05$), kao rezultat razlike u gestacijskoj dobi koja je također statistički značajna. Majke s patološkom trudnoćom imale su statistički značajno manji prirast tjelesne težine što je očekivano obzirom na kraće trajanje trudnoće u odnosu na kontrolnu skupinu trudnica (Mann Whitney test; $p < 0,05$).

Tablica 27. Klinički parametri majki i djece iz prijevremeno porođenih trudnoća kompliciranih s gestacijskim dijabetesom – usporedba s prijevremeno porođenom kontrolnom skupinom

	Kontrola (prijevremena) (n=8)	Gestacijski dijabetes (prijevremeni) (n=7)	p vrijednost
Dob majke	28 ± 02,12	28,71 ± 1,3	0,7542
Paritet	1,375 ± 0,26	1,8 ± 0,37	0,8434
Graviditet	1,75 ± 0,25	1,429 ± 0,20	0,5051
Tjelesna visina majke (cm)	167,4 ± 1,93	1,429 ± 0,20	0,3739
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	72,75 ± 2,22	72,43 ± 3,74	0,7975
Prirast tjelesne težine (kg)	11,38 ± 0,68	10,14 ± 0,8	0,3478
BMI	26,03 ± 0,97	26,80 ± 1,31	0,7091
BMI prije trudnoće	21,94 ± 0,83	23,01 ± 1,24	0,5927
OGTT 0'	4,51 ± 0,24	5,37 ± 0,33	0,0857
OGTT 60'	8,567 ± 0,27	10,32 ± 0,55	0,0436
OGTT 120'	5,56 ± 0,44	9,03 ± 0,94	0,0143
Trajanje gestacije	34 + 2/7 (raspon 31-36 ^{+5/7})	34 + 4/7 (raspon 33 ^{+2/7} -36 ^{+5/7})	0,4205
Sistolički krvni tlak	123,1 ± 2,1	120,0 ± 4,36	0,4319
Dijastolički krvni tlak	79 ± 2,4	75,71 ± 3,69	0,4803
Tjelesna težina ploda (g)	2583 ± 293,4	2670 ± 174,0	0,8683
Tjelesna duljina ploda (cm)	46,88 ± 1,2	47,86 ± 0,8	0,8059
Masa posteljica (g)	467,5 ± 39,94	504,3 ± 52,371	0,6733
Fetoplacentalni omjer	5,21 ± 0,41	5,56 ± 0,57	0,5556
Spol djeteta			
Muško	4	4	
Žensko	4	3	
Način poroda			
SC	4	1	
Vag	4	6	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

U patološkim prijevremeno porođenim trudnoćama zabilježili smo statistički značajno veću vrijednosti GUK u OGTT testu nakon 60 i 120 min u odnosu na kontrolnu prijevremeno

porođenu skupinu, a sve su pacijentice u ispitivanoj skupini klasificirane kao gestacijski dijabetes prema HAPO studiji. (Mann Whitney test; $p < 0,05$).

Ekspresiju SFRP1 proteina analizirali smo zasebno u decidui i u korionskim resicama. Statistički značajno izraženiju ekspresiju ovog antigena izmjerili smo u prijevremeno porođenim posteljicama s gestacijskim dijabetesom u usporedbi s terminskim kontrolama u decidui dok u korionskim resicama razlika nije bila statistički značajna. Statistički je značajno veća i ukupna ekspresija SFRP1 antigena u ispitivanoj skupini posteljica u usporedbi s terminskim kontrolama (Tablica 28). Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom i prikazali na Slikama 23 i 24.

Nasuprot tome, uspoređujući s kontrolnom skupinom prijevremenih poroda, našli smo statistički značajno manju ekspresiju inhibitora Wnt signalnog puta u korionskim resicama u posteljicama roditelja s gestacijskim dijabetesom u odnosu na prijevremene kontrolne posteljice, dok razlike nije bilo ukupno niti zasebno u decidui. Rezultati su prikazani u Tablici 29 te na Slikama 23 i 24.

Tablica 28. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v , mm^0) u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s gestacijskim dijabetesom i eutrofičnom djecom te terminskim kontrolama.

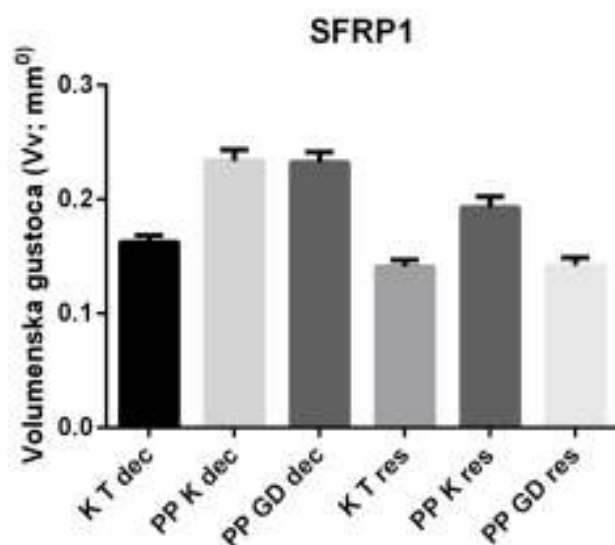
Volumenska gustoća (V_v ; mm^0)	Kontrola (terminska)	Gestacijski dijabetes (prijevremeni)	p vrijednost
Decidua	0.1625±0.005954	0,2320±0.009042	< 0,0001
Korionske resice	0.1408±0.006168	0.1418±0.007168	ns
Cijela posteljica	0.1506±0.004358	0.1848±0.007384	0,0022

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = >0,9999, nesignifikantno) Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

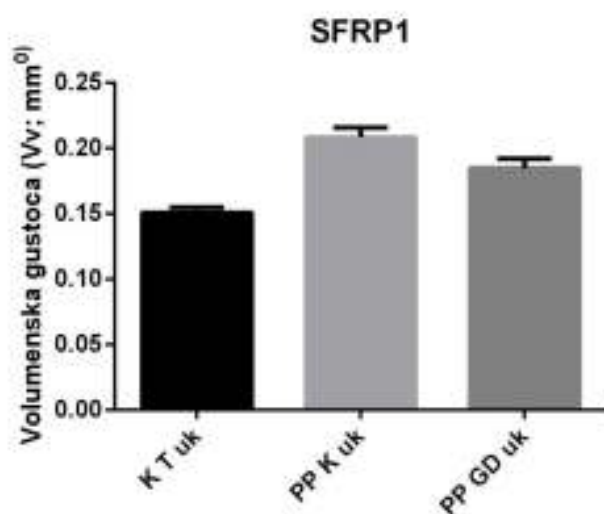
Tablica 29. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v , mm^0) u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća gestacijskim dijabetesom i eutrofičnom djecom te prijevremenim kontrolama.

Volumenska gustoća (V_v ; mm^0)	Kontrola (prijevremena)	Gestacijski dijabetes (prijevremeni)	p vrijednost
Decidua	0.2336±0.009750	0,2320±0.009042	ns
Korionske resice	0.1926±0.009558	0.1418±0.007168	0,0017
Cijela posteljica	0.2085±0.007196	0.1848±0.007384	ns

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = $> 0,9999$, nesignifikantno) Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

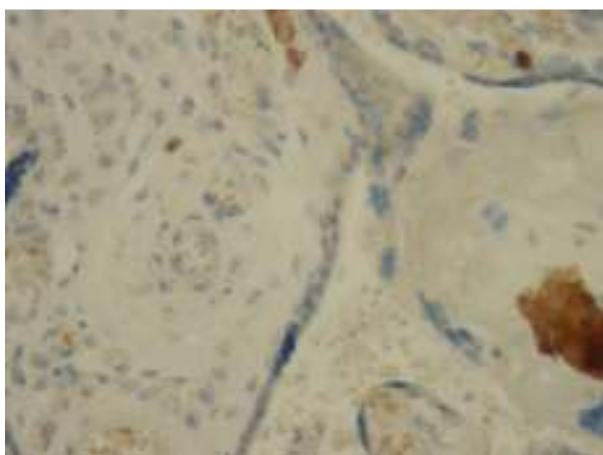


Slika 23. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (Vv, mm⁰) u decidui i korionskim resicama prijevremeno porođenih posteljica iz trudnoća s gestacijskim dijabetesom i eutrofičnom djecom te terminskim i prijevremenim kontrolama. (TK dec = terminske konrole decidua; TK res = terminske kontrole resice; PP GD dec = prijevremeno porođeni gestacijski dijabetes decidua; PP GD res= prijevremeno porođeni gestacijski dijabetes resice; PP K dec= prijevremena kontrola decidua; PP K res= prijevremena kontrola resice)



Slika 24. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s gestacijskim dijabetesom i eutrofičnom djecom (PP GD uk) te terminskim (T K uk) i prijevremenim kontrolama (PP K uk).

Ekspresija proteina SFRP1 bila je izražena je u citoplazmi decidualnih stanica te u korionskim resicama (Slika 25), u citoplazmi viloznog sinciotrofoblasta i citotrofoblasta.



Slika 25. Ekspresija proteina SFRP1 u posteljici uz gestacijski dijabetes (DAB, kontrastirano hemalaunom).

5.1.10. Ekspresija proteina SFRP1 u terminskim posteljicama iz trudnoća s povišenim krvnim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom

U skupini povišenog krvnog tlaka uz gestacijsku šećernu bolest sakupili smo pet terminskih posteljica. Klinički parametri roditelja te tjelesna težina i duljina rođene djece kao i težina posteljica prikazani su u Tablici 30.

Tablica 30. Klinički parametri majki i djece kod terminskih poroda trudnoća s povišenim krvnim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom (RR uz GD) - usporedba s terminskom kontrolnom skupinom

	Kontrola (terminska) (n=25)	RR uz GD (terminski) (n=5)	p vrijednost
Dob majke	28,8±0,87	34,60±2,04	0,0176
Paritet	1,560±0,1536	2,00±0,77	0,8397
Graviditet	1,640±0,1621	2,20±0,97	>0,9999
Tjelesna visina majke (cm)	168,2±0,94	168,8±2,58	>0,9999
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	76,3±1,81	102,6±4,51	<0,0001
Prirast tjelesne težine (kg)	16,16±0,85	12,40±2,84	0,2195
BMI	26,95±0,57	35,98±1,22	<0,0001
BMI prije trudnoće	21,26±0,48	31,64±1,72	<0,0001
OGTT 0'	4,39±0,08	5,38±0,2	0,0002
OGTT 60'	5,23±0,17	10,05±0,81	0,0071
OGTT 120'	5,63±0,31	8,86±0,85	0,0021
Trajanje gestacije	39+3/7 (raspon 38 ^{+1/7} -41 ^{+2/7})	38+6/7 (raspon 38 ^{+3/7} -39 ^{+6/7})	0,0641
Sistolički krvni tlak	117,8±1,83	157±3,00	<0,0001
Dijastolički krvni tlak	74±1,16	107±3,74	<0,0001
Tjelesna težina ploda (g)	3488±73	3226±47,39	0,0548
Tjelesna duljina ploda (cm)	50,84±0,24	50,6±0,6	0,6253
Masa posteljica (g)	613,2±40,68	496±50,56	0,1537
Fetoplacentalni omjer	6,19±0,38	6,77±0,69	0,6656
Spol djeteta			
Muško	14	4	
Žensko	11	1	
Način poroda			
Carski rez	2	3	
Vaginalni porod	23	2	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa (p<0,05) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Dob trudnice, tjelesna težina majke kod poroda, BMI na porodu i prije trudnoće statistički su značajno veći u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu. (Mann Whitney test;

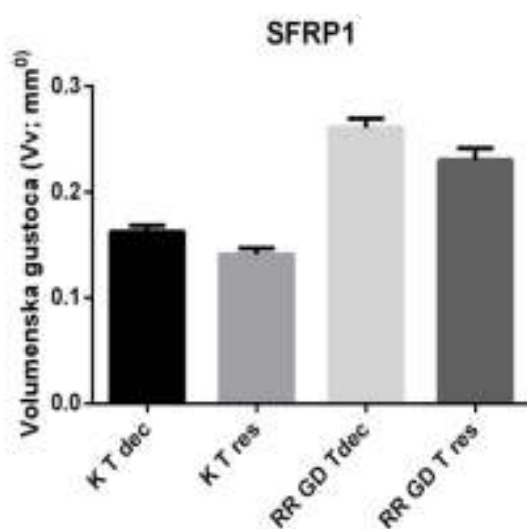
$p < 0,05$). Također je u patološkoj skupini statistički značajno povišen GUK na tašte te nakon 60 i 120 min u OGTT testu, kao i vrijednosti krvnog tlaka u odnosu na kontrolnu skupinu terminskih trudnica (Mann Whitney test; $p < 0,05$).

Ekspresiju SFRP1 proteina analizirali smo zasebno u deicidui i u korionskim resicama, kao i ukupnu ekspresiju u posteljici. Statistički značajno izraženiju ekspresiju ovog antigena izmjerili smo u decidui i korionskim resicama patoloških posteljica u odnosu na kontrolnu skupinu terminskih posteljica. Statistički je značajno veća i ukupna ekspresija SFRP1 u posteljicama s povišenim tlakom i gestacijskom šećernom bolesti u odnosu na kontrolnu terminsku skupinu. (Tablica 31).. Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom i prikazali na Slikama 26 i 27.

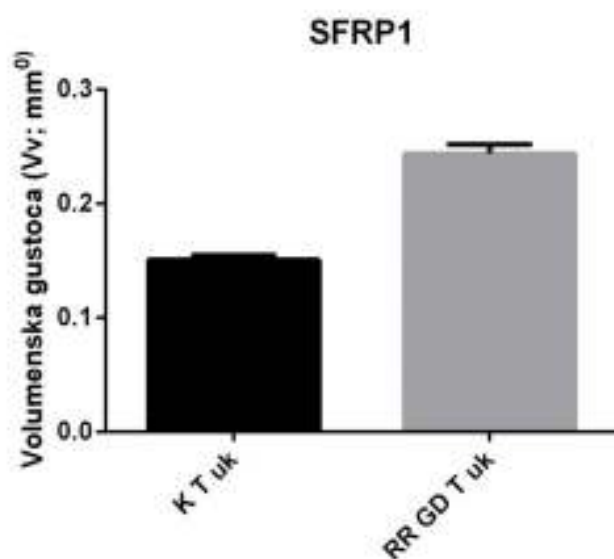
Tablica 31. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v , mm^0) u terminskim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom (RR uz GD) te u terminskim kontrolama.

Volumenska gustoća (V_v ; mm^0)	Kontrola (terminska)	RR uz GD (terminski)	p vrijednost
Decidua	$0,1625 \pm 0,005954$	$0,2606 \pm 0,008831$	< 0,0001
Korionske resice	$0,1408 \pm 0,006168$	$0,2302 \pm 0,01095$	< 0,0001
Cijela posteljica	$0,1506 \pm 0,004358$	$0,2439 \pm 0,007874$	< 0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 26. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v , mm^0) u decidui i korionskim resicama terminskih kontrolnih posteljica te terminskih posteljica iz trudnoća s povišenim tlakom i gestacijskim dijabetesom. (KT dec= terminske kontrole decidua; KT res= terminske kontrole resice; RR GD T dec= terminski povišeni tlak s gestacijskim dijabetesom decidua; RR GD T res= terminski povišeni tlak s gestacijskim dijabetesom resice)



Slika 27. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v , mm^0) u terminskim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom i gestacijskim dijabetesom (RR GD T uk) i kontrolnim terminskim posteljicama (KT uk).

5.1.11. Ekspresija proteina SFRP1 u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim krvnim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom

U skupini povišenog krvnog tlaka majke uz gestacijsku šećernu bolest sakupili smo pet prijevremeno porođenih posteljica. Klinički parametri roditelja te tjelesna težina i duljina rođene djece kao i težina posteljica prikazani su u Tablici 32.

Tablica 32. Klinički parametri majki i djece kod prijevremenih poroda iz trudnoća s povišenim krvnim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom (RR uz GD) - usporedba s terminskom kontrolnom skupinom

	Kontrola (terminska) (n=25)	RR uz GD (prijevremeni) (n=5)	p vrijednost
Dob majke	28,8±0,87	32,8±1,46	0,0491
Paritet	1,560±0,1536	1,2±0,2	0,4752
Graviditet	1,640±0,1621	1,6±0,4	>0,9999
Tjelesna visina majke (cm)	168,2±0,94	165,6±1,03	0,1373
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	76,3±1,81	90,4±5,83	0,0196
Prirast tjelesne težine (kg)	16,16±0,85	11,2±2,9	0,1182
BMI	26,95±0,57	33,02±2,43	0,0054
BMI prije trudnoće	21,26±0,48	28,98±2,83	0,0007
OGTT 0'	4,39±0,08	5,16±0,21	0,0014
OGTT 60'	5,23±0,17	10,1±0,56	<0,0001
OGTT 120'	5,63±0,31	8,56±0,35	<0,0001
Trajanje gestacije	39+3/7 (raspon 38 ^{+1/7} -41 ^{+2/7})	33+6/7 (raspon 30 ^{+6/7} -36 ^{+5/7})	<0,0001
Sistolički krvni tlak	117,8±1,83	156±4	<0,0001
Dijastolički krvni tlak	74±1,16	106±4	<0,0001
Tjelesna težina ploda (g)	3488±73	2246±398,5	0,0044
Tjelesna duljina ploda (cm)	50,84±0,24	46,5±1,71	0,0191
Masa posteljica (g)	613,2±40,68	374±71,6	0,0159
Fetoplacentalni omjer	6,19±0,38	6,09±0,68	0,8362
Spol djeteta			
Muško	14	2	
Žensko	11	3	
Način poroda			
Carski rez	2	5	
Vaginalni porod	23	0	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa (p<0,05) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Dob trudnice, tjelesna težina majke kod poroda, BMI na porodu i prije trudnoće statistički su značajno veći u ispitivanoj skupini u odnosu na terminsku kontrolnu skupinu.

(Mann Whitney test; $p < 0,05$). Također je u patološkoj skupini statistički značajno viši GUK na tašte te nakon 60 i 120 min u OGTT testu, kao i vrijednosti krvnog tlaka u odnosu na kontrolnu skupinu terminskih trudnica (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Također je statistički značajna razlika u težini i duljini djece i masi posteljice, što je sukladno statistički značajnoj razlici u gestacijskoj dobi između kontrolne terminske skupine i prijevremeno porođene djece iz trudnoća s tlakom i gestacijskom šećernom bolesti. Rezultati su dobiveni Mann Whitney testom; $p < 0,05$.

Ekspresiju SFRP1 proteina analizirali smo zasebno u decidui i u korionskim resicama, kao i ukupnu ekspresiju u posteljici. Statistički značajno izraženiju ekspresiju ovog antigena izmjerili smo u decidui i korionskim resicama patoloških posteljica u odnosu na kontrolnu skupinu terminskih posteljica. Statistički je značajno veća i ukupna ekspresija SFRP1 u posteljicama s povišenim tlakom i gestacijskom šećernom bolesti u odnosu na kontrolnu terminsku skupinu. (Tablica 33). Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom i prikazali na Slikama 28 i 29.

Tablica 33. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom i gestacijskim dijabetesom (RR uz GD) te u terminskim kontrolama.

Volumenska gustoća ($V_v; \text{mm}^0$)	Kontrola (terminska)	RR uz GD (prijevremeni)	p vrijednost
Decidua	0,1625±0,005954	0,2749±0,01296	< 0,0001
Korionske resice	0,1408±0,006168	0,2345±0,01141	< 0,0001
Cijela posteljica	0,1506±0,004358	0,2464±0,009618	< 0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Tablica 34. Klinički parametri majki i djece kod prijevremenih poroda iz trudnoća s povišenim krvnim tlakom i gestacijskim dijabetesom (RR uz GD) - usporedba s kontrolnom skupinom prijevremenih poroda

	Kontrola (prijevremena) (n=8)	RR uz GD (prijevremeni) (n=5)	p vrijednost
Dob majke	28 ±02,12	32,8±1,46	0,0995
Paritet	1,375±0,26	1,2±0,2	0,8368
Graviditet	1,75±0,25	1,6±0,4	0,6348
Tjelesna visina majke (cm)	167,4±1,93	165,6±1,03	0,7591
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	72,75±2,22	90,4±5,83	0,0023
Prirast tjelesne težine (kg)	11,38±0,68	11,2±2,9	0,2844
BMI	26,03±0,97	33,02±2,43	0,0016
BMI prije trudnoće	21,94±0,83	28,98±2,83	0,0171
OGTT 0'	4,51±0,24	5,16±0,21	0,0476
OGTT 60'	8,567±0,27	10,1±0,56	0,2
OGTT 120'	5,56±0,44	8,56±0,35	0,0159
Trajanje gestacije	34 +2/7 (raspon 31-36 ^{+5/7})	33+6/7 (raspon 30 ^{+6/7} -36 ^{+5/7})	0,8858
Sistolički krvni tlak	123,1±2,1	156±4	0,0016
Dijastolički krvni tlak	79±2,4	106±4	0,0008
Tjelesna težina ploda (g)	2583±293,4	2246±398,5	0,6277
Tjelesna duljina ploda (cm)	46,88±1,2	46,5±1,71	0,7429
Masa posteljica (g)	467,5±39,94	374±71,6	0,0971
Fetoplacentalni omjer	5,21±0,41	6,09±0,68	0,3543
Spol djeteta			
Muško	4	2	
Žensko	4	3	
Način poroda			
Carski rez	4	5	
Vaginalni porod	4	0	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa (p<0,05) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

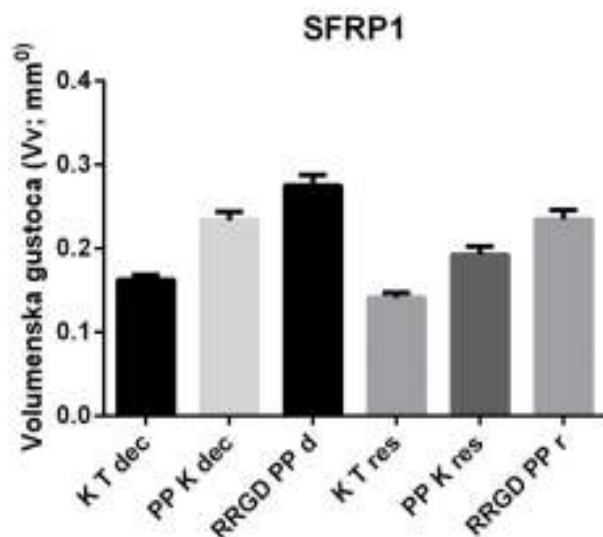
Tjelesna težina majke kod poroda, BMI na porodu i prije trudnoće statistički su značajno veći u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu prijevremeno porođenu skupinu (Mann Whitney test; p<0,05). Također je u patološkoj skupini statistički značajno povišen GUK na tašte te nakon 120 min u OGTT testu, kao i vrijednosti krvnog tlaka u odnosu na kontrolnu skupinu prijevremeno porođenih trudnica (Mann Whitney test; p<0,05). Tjelesna težina i duljina djece te masa posteljice nisu statistički značajno različiti, već su primjereni gestacijskoj dobi u obje skupine prijevremeno porođene djece. Rezultati su dobiveni Mann Whitney testom; p<0,05.

Ekspresiju SFRP1 proteina analizirali smo zasebno u decidui i u korionskim resicama, kao i ukupnu ekspresiju u posteljici. Izraženiju ekspresiju ovog antigena izmjerili smo u decidui i korionskim resicama patoloških posteljica u odnosu na kontrolnu skupinu prijevremeno porođenih posteljica, no razlika nije bila statistički značajna. Jednako tako, veća je i ukupna ekspresija SFRP1 u posteljicama s povišenim tlakom i gestacijskom šećernom bolesti u odnosu na kontrolnu prijevremeno porođenu skupinu, no razlika nije statistički značajna. (Tablica 35). Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom i prikazali na Slikama 28 i 29.

Tablica 35. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v , mm^0) u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom i gestacijskim dijabetesom (RR uz GD) te u prijevremenim kontrolama.

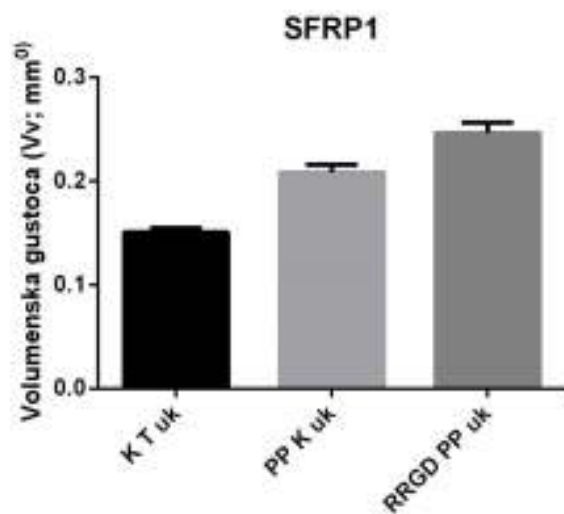
Volumenska gustoća (V_v ; mm^0)	Kontrola (prijevremena)	RR uz GD (prijevremeni)	p vrijednost
Decidua	0.2336 ± 0.009750	$0,2749 \pm 0,01296$	0,4267
Korionske resice	0.1926 ± 0.009558	$0,2345 \pm 0,01141$	0,1303
Cijela posteljica	0.2085 ± 0.007196	$0,2464 \pm 0,009618$	0,1050

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom.



Slika 28. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v , mm^0) u decidui i korionskim resicama prijevremeno porođenih posteljica iz trudnoća s povišenim tlakom i gestacijskim dijabetesom i kontrolnim terminskim i prijevremeno porođenim posteljicama.

(KT dec= terminska kontrola decidua; PP K dec= prijevremena kontrola decidua; RR GD PP d= prijevremeno porođeni tlak s gestacijskim dijabetesom decidua; KT res= terminska kontrola resice; PP K res= prijevremena kontrola resice; RR GD PP r= prijevremeno porođeni tlak s gestacijskim dijabetesom resice)



Slika 29. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP1 antigena (Vv, mm³) u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom i gestacijskim dijabetesom (RRGD PP uk) i kontrolnim terminskim (KT uk) i prijevremeno porođenim posteljicama (PP K uk).

5.1.12. Ekspresija proteina SFRP1 u terminskim posteljicama kod zastoja u rastu ploda uz gestacijsku šećernu bolest

U skupini sa zastojem u rastu uz gestacijsku šećernu bolest sakupili smo pet posteljica. Klinički parametri roditelja te tjelesna težina i duljina rođene djece kao i težina posteljica prikazani su u Tablici 36.

Tablica 36. Klinički parametri majki i djece kod zastoja u rastu uz gestacijski dijabetes (IUGR uz GD)

	Kontrola (terminska) (n=25)	IUGR uz GD (terminski) (n=5)	p vrijednost
Dob majke	28,8±0,87	27,8±3,09	0,7366
Paritet	1,560±0,1536	1±0	0,1454
Graviditet	1,640±0,1621	1,2±0,2	0,3644
Tjelesna visina majke (cm)	168,2±0,94	166±1,97	0,4553
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	76,3±1,81	77,6±7,1	0,9470
Prirast tjelesne težine (kg)	16,16±0,85	11,75±2,69	0,1443
BMI	26,95±0,57	28±2,06	0,7969
BMI prije trudnoće	21,26±0,48	24,54±3,15	0,2711
OGTT 0'	4,39±0,08	5,26±0,2	0,0003
OGTT 60'	5,23±0,17	10,1±0,8	0,0119
OGTT 120'	5,63±0,31	6,73±0,53	0,1246
Trajanje gestacije	39+3/7 (raspon 38 ^{+1/7} -41 ^{+2/7})	38 +2/7 (raspon 37 – 40 ^{+2/7})	0,0071
Sistolički krvni tlak	117,8±1,83	129±5,1	0,0414
Dijastolički krvni tlak	74±1,16	74±4	0,7271
Tjelesna težina ploda (g)	3488±73	2434±86,98	<0,0001
Tjelesna duljina ploda (cm)	50,84±0,24	47,2±0,92	0,0005
Masa posteljica (g)	613,2±40,68	374±21,12	0,0002
Fetoplacentalni omjer	6,19±0,38	6,73±0,54	0,3410
Spol djeteta			
Muško	14	0	
Žensko	11	5	
Način poroda			
Carski rez	2	3	
Vaginalni porod	23	2	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa ($p<0,05$) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

U patološkim trudnoćama zabilježili smo statistički značajno povećanje sistoličkog krvnog tlaka u odnosu na kontrolu (Mann Whitney test; $p<0,05$) iako se prema vrijednostima tlaka pacijentice ne klasificiraju kao hipertenzija. Također je statistički značajna razlika

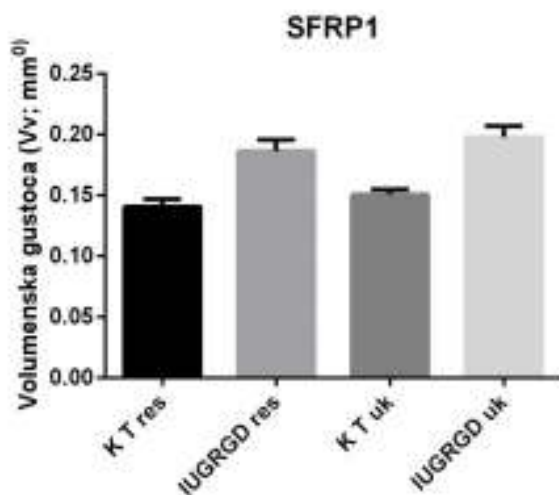
nađena u OGTT testu na tašte i nakon 60 min. Tjelesna težina i duljina djece kao i masa posteljice statistički su značajno veće u kontrolnim trudnoćama u usporedbi s istim parametrima dobivenim kod gestacijske šećerne bolesti uz zatoj u rastu ploda (Mann Whitney test; $p < 0,05$).

Analizirali smo ukupnu ekspresiju SFRP1 proteina u posteljici te zasebno u korionskim resicama. Statistički značajno izraženiju ekspresiju ovog antigena izmjerili smo u terminskim posteljicama iz trudnoća s IUGR uz gestacijski dijabetes u usporedbi s terminskim kontrolama kako u korionskim resicama tako i ukupno u posteljici. (Tablica 37). Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom i prikazali na Slici 30.

Tablica 37. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u terminskim posteljicama iz trudnoća sa zastojem u rastu ploda uz gestacijsku šećernu bolest (IUGR uz GD) i terminskim kontrolama.

Volumenska gustoća ($V_v; \text{mm}^0$)	Kontrola (terminska)	IUGR uz GD (terminski)	p vrijednost
Korionske resice	$0,1366 \pm 0.0068$	$0,1866 \pm 0.009319$	0,0204
Ukupna ekspresija	$0,1432 \pm 0.0048$	$0,1980 \pm 0.0092$	0,0054

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 30. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) te volumenske gustoće u korionskim resicama u terminskim posteljicama iz trudnoća sa zastojem u rastu ploda uz gestacijski dijabetes te u kontrolnoj skupini terminskih posteljica. (KT res= terminska kontrola resice; IUGRGD res= terminski zastoje u rastu s gestacijskim dijabetesom)

resice; KT uk= terminska kontrola ukupno; IUGRGD uk= terminski zastoј u rastu s gestacijskim dijabetesom ukupno)

5.1.13. Ekspresija proteina SFRP1 u posteljicama kod anomalija ploda

U skupini anomalija ploda sakupili smo osam posteljica. U četiri slučaja radilo se o anomalijama mokraćnog sustava (lijevostrani multicistični bubreg, bilateralna hidronefroza, te dva puta ageneza bubrega), dva slučaja bili su kompleksne srčane greške, jednom ventrikulomegalija i jednom jedna umbilikalna arterija (*engl. single umbilical artery*).

Klinički parametri roditelja te tjelesna težina i duljina rođene djece kao i težina posteljica prikazani su u Tablici 38.

Tablica 38. Klinički parametri majki i djece kod anomalija ploda

	Kontrola (terminska) (n=26)	Anomalije (n=8)	p vrijednost
Dob majke	28,8±0,87	26,5±1,46	0,2562
Paritet	1,560±0,1536	1,250±0,16	0,4023
Graviditet	1,640±0,1621	1,625±0,26	>0,9999
Tjelesna visina majke (cm)	168,2±0,94	165,1±2,78	0.2724
Tjelesna težina majke kod poroda (kg)	76,3±1,81	79,57±8,47	0.9378
Prirast tjelesne težine (kg)	16,16±0,85	14,71±1,89	0.5370
BMI	26,95±0,57	25,68±4,55	0.7950
BMI prije trudnoće	21,26±0,48	20,9±3,95	0.7494
OGTT 0'	4,39±0,08	4,72±0,24	0.1261
OGTT 60'	5,23±0,17	8,6	
OGTT 120'	5,63±0,31	6,02±0,72	0.5644
Trajanje gestacije	39+3/7 (Raspon 38 ^{+1/7} -41 ^{+2/7})	38 +4/7 (Raspon 38 ^{+2/7} -41 ^{+1/7})	0,0482
Sistolički krvni tlak	117,8±1,83	123,8±5,24	0.3074
Dijastolički krvni tlak	74±1,16	80,0±4,63	0.1777
Tjelesna težina ploda (g)	3488±73	2891±216,8	0,0080
Tjelesna duljina ploda (cm)	50,84±0,24	47,83±1,58	0.0352
Masa posteljica (g)	613,2±40,68	472,9±34,62	0,0245
Fetoplacentalni omjer	6,19±0,38	6±0,29	0.5320
Spol djeteta			
Muško	14	4	
Žensko	11	4	
Način poroda			
Carski rez	2	3	
Vaginalni porod	23	5	

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa (p<0,05) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Tjelesna težina djeteta i duljina djeteta kao i masa posteljica statistički su značajno veće u kontrolnim trudnoćama u usporedbi s istim parametrima dobivenim kod anomalija ploda (Mann Whitney test; $p < 0,05$).

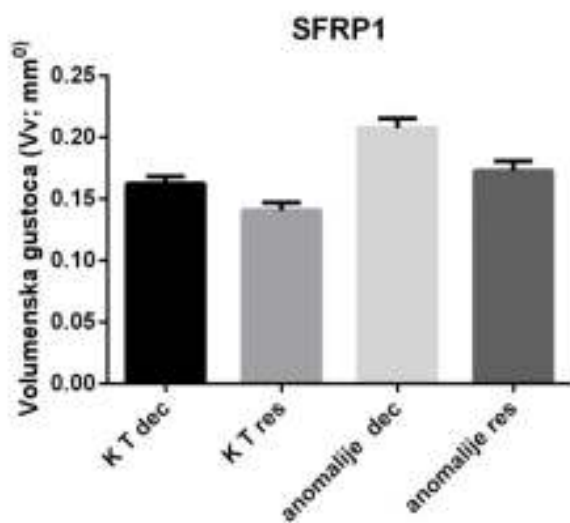
Ekspresiju SFRP1 proteina analizirali smo zasebno u decidui i u korionskim resicama. Statistički značajno izraženiju ekspresiju ovog antigena izmjerili smo u posteljicama kod anomalija ploda u usporedbi s kontrolama kako u decidui tako i u korionskim resicama (Tablica 39). Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom i prikazali na Slikama 31 i 32.

Također smo usporedili cjelokupnu ekspresiju ovog proteina u obje vrste posteljica te dobili statistički značajno veću ekspresiju u patološkim uzorcima (Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom; $p > 0,05$)

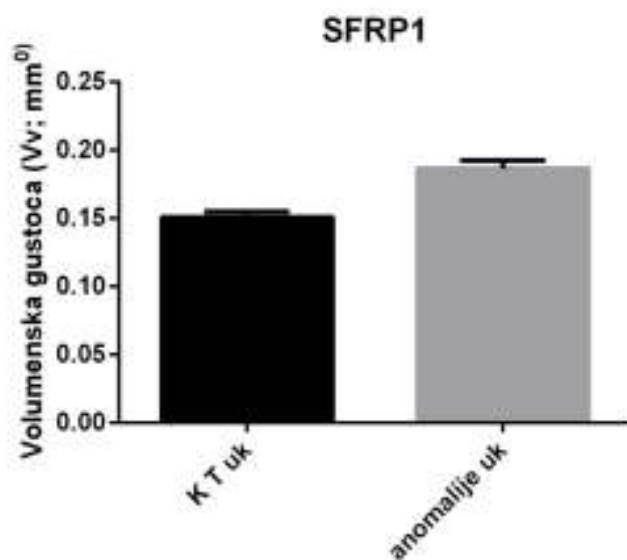
Tablica 39. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u posteljicama djece s anomalijom i u terminskim kontrolama.

Volumenska gustoća ($V_v; \text{mm}^0$)	Kontrola (terminska)	anomalija	p vrijednost
Decidua	$0,1625 \pm 0,005954$	0.2075 ± 0.0078	0,005
Korionske resice	$0,1408 \pm 0,006168$	0.1728 ± 0.00798	0,0168
Cijela posteljica	$0,1506 \pm 0,004358$	0.1865 ± 0.0059	0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

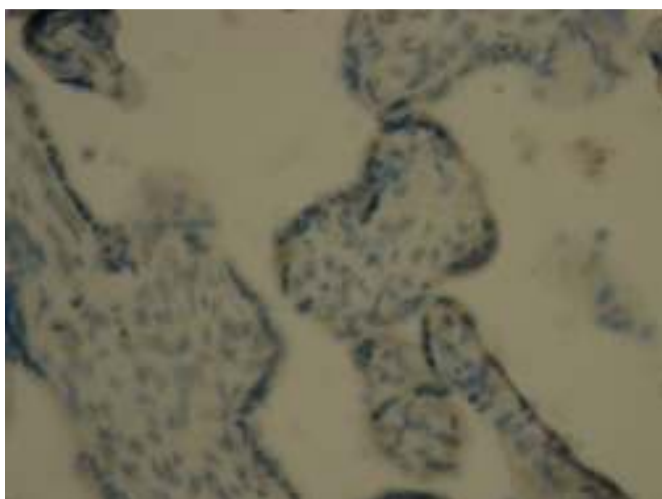


Slika 31. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u decidui i korionskim resicama posteljica kod anomalija ploda i u terminskim kontrolama. (KT dec= terminska kontrola decidua; KT res= terminska kontrola resice)



Slika 32. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u posteljicama kod anomalija ploda (anomalije uk) i u terminskim kontrolama (KT uk= terminske kontrole ukupno).

Ekspresija proteina SFRP1 bila je izražena je u citoplazmi decidualnih stanica te u korionskim resicama (Slika 33), u citoplazmi viloznog sinciotrofoblasta i citotrofoblasta.



Slika 33. Ekspresija proteina SFRP1 u posteljici s anomalijom ploda (DAB, kontrastirano hemalaunom).

5.1.14. Usporedba ekspresije proteina SFRP1 u terminskim patološkim posteljicama s terminskim i prijevremenim kontrolama

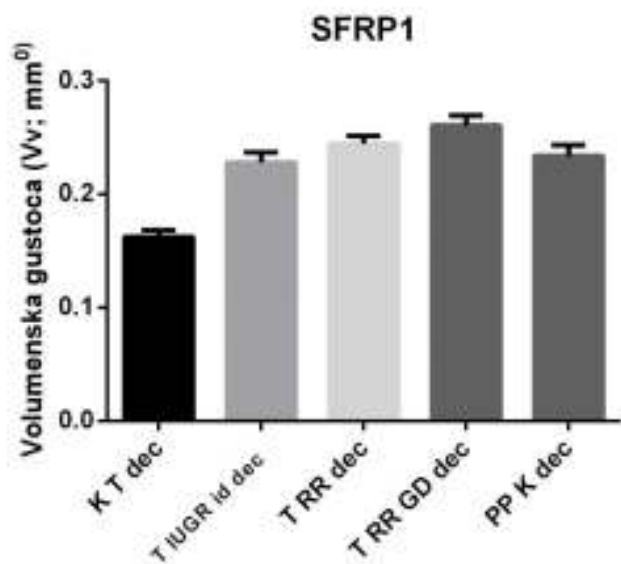
Ekspresiju SFRP1 proteina analizirali smo zasebno u decidui i u korionskim resicama, kao i ukupnu ekspresiju u posteljici, te usporedili međusobno terminsku patologiju s terminskim i prijevremenim kontrolama.

Rezultate smo prikazali u Tablici 40, 41 i 42 i Slikama 34, 35 i 36.

Tablica 40. Usporedba ekspresije proteina SFRP1 u decidui terminskih patoloških posteljica s terminskim i prijevremenim kontrolama

decidua	Kontrole (terminske) p vrijednost	Kontrole (prijevremene) p vrijednost
Terminski idiopatski IUGR	< 0,0001	ns
Terminski tlak	< 0,0001	ns
Terminski tlak i dijabetes	< 0,0001	0,4438
Anomalije	0,005	0,9657

Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA, s post hoc Dunnovim testom. (ns = $> 0,9999$, nesignifikantno) Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

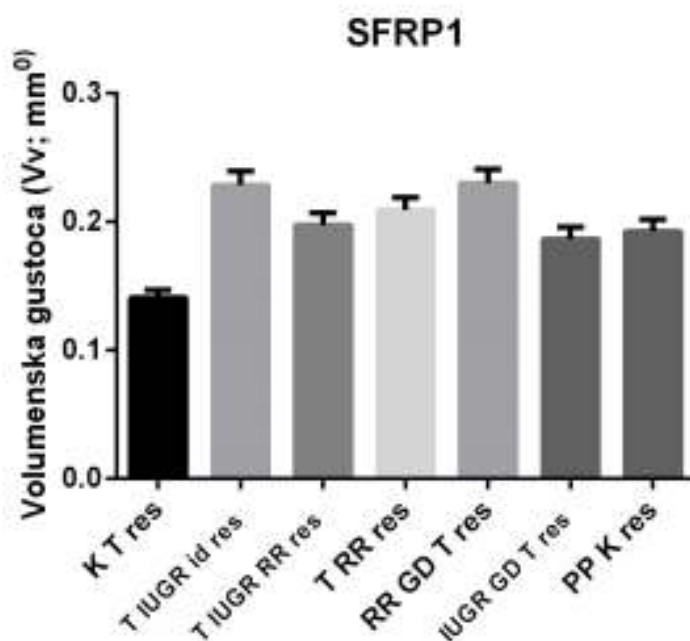


Slika 34. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^3) u decidui posteljica iz patoloških trudnoća te u terminskim i prijevremenim kontrolama (KT dec= terminske kontrole decidua; T IUGR id dec= terminski idiopatski IUGR decidua; T RR dec= terminski tlak decidua; T RR GD dec= terminski tlak s gestacijskim dijabetesom decidua; PP K dec= prijevremene kontrole decidua)

Tablica 41. Usporedba ekspresije proteina SFRP1 u korionskim resicama terminskih patoloških posteljica s terminskim i prijevremenim kontrolama

korionske resice	Kontrole (terminske) p vrijednost	Kontrole (prijevremene) p vrijednost
Terminski idiopatski IUGR	< 0,0001	0,2472
Terminski IUGR s tlakom	0,0258	ns
Terminski tlak	< 0,0001	ns
Terminski tlak i dijabetes	< 0,0001	0,1803
Terminski IUGR i dijabetes	0,0204	ns
Anomalije	0,0168	ns

Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns= >0,9999, nesignifikantno) Podačane vrijednosti su statistički značajne.

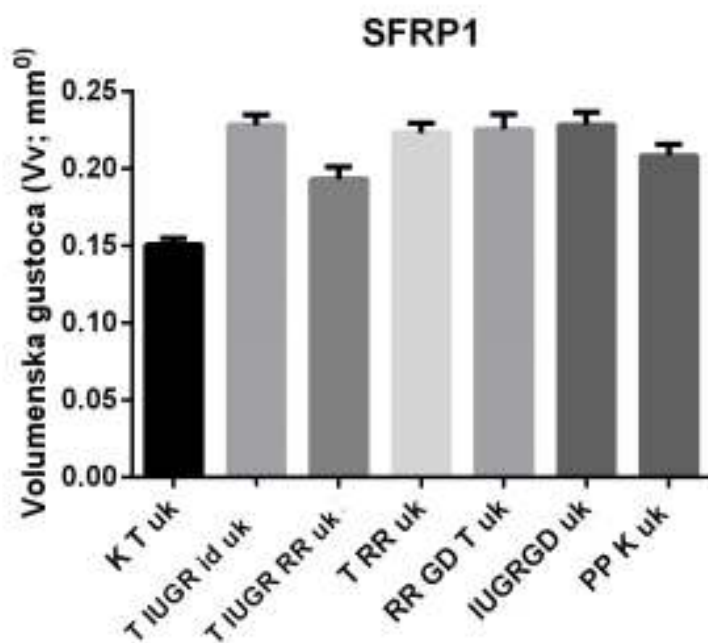


Slika 35. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 antigena (V_v, mm^0) u korionskim resicama posteljica iz patoloških trudnoća te u terminskim i prijevremenim kontrolama. (KT res= terminske kontrole resice; T IUGR id res= terminski idiopatski IUGR resice; T IUGR RR res= terminski IUGR s povišenim tlakom resice; T RR res= terminski tlak resice; RR GD T res= terminski tlak s gestacijskim dijabetesom resice; IUGR GD T res=terminski zastoj u rastu s gestacijskim dijabetesom resice; PP K res= prijevremene kontrole resice)

Tablica 42. Usporedba ukupne ekspresije proteina SFRP1 u terminskim patološkim posteljicama s terminskim i prijevremenim kontrolama

Ukupna ekspresija	Kontrole (terminske) p vrijednost	Kontrole (prijevremene) p vrijednost
Terminski idiopatski IUGR	< 0,0001	0,8930
Terminski IUGR s tlakom	0,0907	ns
Terminski tlak	< 0,0001	ns
Terminski tlak i dijabetes	<0,0001	ns
Terminski IUGR i dijabetes	0,0054	0,3882
Anomalije	< 0,0001	ns

Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns= >0,9999, nesignifikantno) Podačane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 36. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP1 antigena (Vv, mm⁰) u posteljicama iz patoloških trudnoća te u terminskim i prijevremenim kontrolama. (KT uk= terminske kontrole ukupno; T IUGR id uk= terminski idiopatski IUGR ukupno; T IUGR RR uk= terminski IUGR s povišenim tlakom ukupno; T RR uk= terminski tlak ukupno; RR GD T uk= terminski tlak s gestacijskim dijabetesom ukupno; IUGR GD T uk=terminski zastoj u rastu s gestacijskim dijabetesom ukupno; PP K uk= prijevremene kontrole ukupno)

Statistički značajno izraženiju ukupnu ekspresiju SFRP1 antigena kao i statistički značajniju ekspresiju zasebno u decidui i korionskim resicama izmjerili smo u svim ispitivanim skupinama patoloških terminskih posteljica u odnosu na kontrolnu skupinu terminskih posteljica (osim terminskog IUGR s tlakom koji je imao premalen uzorak decidue

za samostalnu analizu, što vjerojatno utječe na statistički dobiveni nesigantan rezultat). Navedene rezultate smo izračunali Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom i prikazali na Slikama 34, 35 i 36.

Uspoređujući skupine terminskih patoloških posteljica s kontrolnom skupinom prijevremeno porođenih posteljica, pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom nismo našli statistički značajnu razliku u ukupnoj ekspresiji SFRP1 antigena. Jednako tako, nije bilo statistički značajne razlike između terminske patologije i kontrolnih prijevremeno porođenih posteljica niti zasebno u korionskim resicama i decidui.

Navedene rezultate smo prikazali na Slikama 34, 35 i 36.

5.1.15. Usporedba ekspresije proteina SFRP1 u prijevremeno porođenim patološkim posteljicama s terminskim i prijevremenim kontrolama

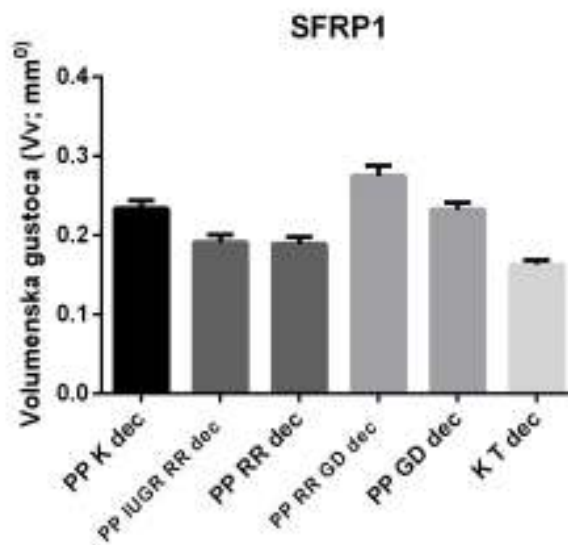
Ekspresiju SFRP1 proteina analizirali smo zasebno u decidui i u korionskim resicama, kao i ukupnu ekspresiju u posteljici, te usporedili međusobno prijevremeno porođene posteljice iz patoloških trudnoća s terminskim i prijevremenim kontrolama.

Rezultate smo prikazali u Tablici 43, 44 i 45 i Slikama 37, 38 i 39.

Tablica 43. Usporedba ekspresije proteina SFRP1 u decidui prijevremeno porođenih patoloških posteljica s terminskim i prijevremenim kontrolama

decidua	Kontrole (terminske) p vrijednost	Kontrole (prijevremene) p vrijednost
Prijevremeni IUGR s tlakom	0,0233	0,1016
Prijevremeni tlak	0,0372	0,1668
Prijevremeni tlak i dijabetes	< 0,0001	0,4267
Prijevremeni dijabetes	< 0,0001	ns

Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns= >0,9999, nesigantan) Povećane vrijednosti su statistički značajne.

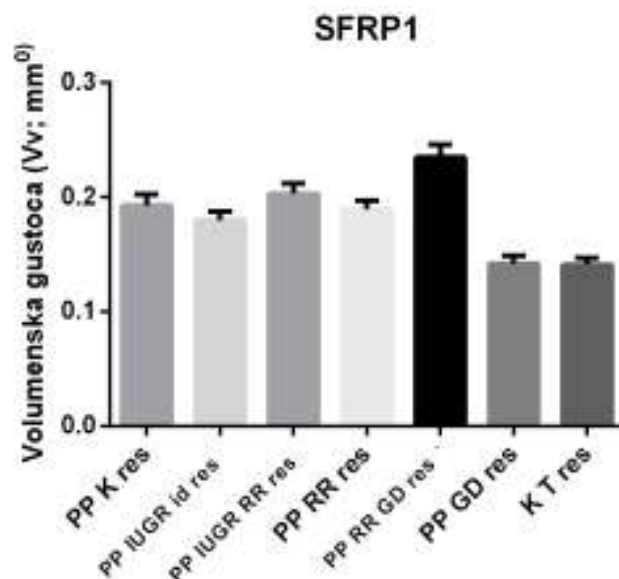


Slika 37. Usporedba ekspresije SFRP1 u decidui patoloških skupina prijevremeno porođenih posteljica s kontrolnom skupinom prijevremeno porođenih posteljica i terminskim kontrolama. (PP K dec= prijevremene kontrole decidua; PP IUGR RR dec= prijevremeno porođeni zastoj u rastu s povišenim tlakom decidua; PP RR dec= prijevremeno porođeni tlak decidua; PP RR GD dec= prijevremeno porođeni tlak s gestacijskim dijabetesom decidua; PP GD dec= prijevremeno porođeni gestacijski dijabetes decidua; KT dec= terminske kontrole decidua)

Tablica 44. Usporedba ekspresije proteina SFRP1 u korionskim resicama prijevremeno porođenih patoloških posteljica s terminskim i prijevremenim kontrolama

Korionske resice	Kontrole (terminske) p vrijednost	Kontrole (prijevremene) p vrijednost
Prijevremeni idiopatski IUGR	0,0209	ns
Prijevremeni IUGR s tlakom	0,0001	ns
Prijevremeni tlak	0,0001	ns
Prijevremeni tlak i dijabetes	< 0,0001	0,1303
Prijevremeni dijabetes	n.s.	0,0017

Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns= $> 0,9999$, nesignifikantno) Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

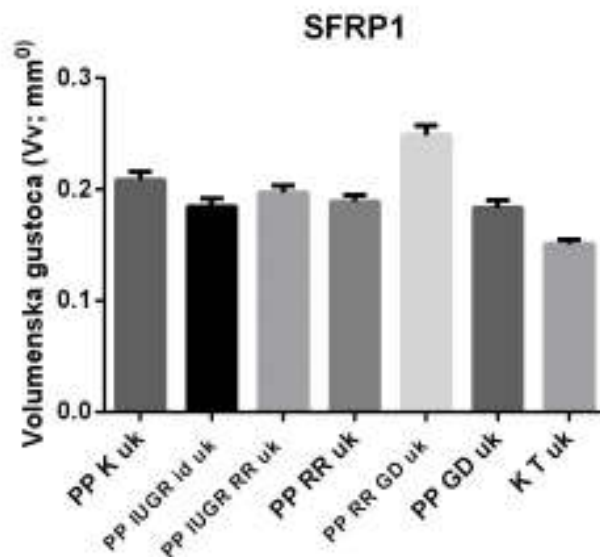


Slika 38. Usporedba ekspresije SFRP1 u korionskim resicama patoloških skupina prijevremeno porođenih posteljica s kontrolnim skupinama prijevremeno porođenih i terminskih posteljica. (PP K res= prijevremene kontrole resice; PP IUGR id res= prijevremeno porođeni idiopatski IUGR resice; PP IUGR RR res= prijevremeno porođeni IUGR s povišenim tlakom resice; PP RR res= prijevremeno porođeni tlak resice; PP RR GD res= prijevremeno porođeni tlak s gestacijskim dijabetesom resice; PP GD res= prijevremeno porođeni gestacijski dijabetes resice; KT res= terminske kontrole resice).

Tablica 45. Usporedba ukupne ekspresije proteina SFRP1 u prijevremeno porođenim patološkim posteljicama s terminskim i prijevremenim kontrolama

Ukupna ekspresija	Kontrole (terminske) p vrijednost	Kontrole (prijevremene) p vrijednost
Prijevremeni idiopatski IUGR	0,0101	0,5516
Prijevremeni IUGR s tlakom	0,001	ns
Prijevremeni tlak	< 0,0001	ns
Prijevremeni tlak i dijabetes	< 0,0001	0,1050
Prijevremeni dijabetes	0,0022	0,1916

Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns= >0,9999, nesigifikantno) Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 39. Usporedba ukupne ekspresije SFRP1 u patološkim skupinama prijevremeno porođenih posteljica s kontrolnom skupinom terminskih i prijevremeno porođenih posteljica. (PP K uk= prijevremene kontrole ukupno; PP IUGR id uk= prijevremeno porođeni idiopatski IUGR ukupno; PP IUGR RR uk= prijevremeno porođeni IUGR s povišenim tlakom ukupno; PP RR uk= prijevremeno porođeni tlak ukupno; PP RR GD uk= prijevremeno porođeni tlak s gestacijskim dijabetesom ukupno; PP GD uk= prijevremeno porođeni gestacijski dijabetes ukupno; K T uk= terminske kontrole ukupno).

Statistički značajno izraženiju ukupnu ekspresiju SFRP1 antigena izmjerili smo u svim ispitivanim skupinama patoloških prijevremeno porođenih posteljica u odnosu na kontrolnu skupinu terminskih posteljica.

Uspoređujući skupine prijevremeno porođenih patoloških posteljica s kontrolnom skupinom prijevremeno porođenih posteljica, nismo našli statistički značajnu razliku u ukupnoj ekspresiji SFRP1 niti u jednoj patološkoj skupini.

U decidui, statistički su se razlikovale sve skupine posteljica iz patoloških trudnoća, a osobito one iz trudnoća kompliciranih gestacijskim dijabetesom (samo GD i GD uz povišeni tlak majke) u odnosu na terminsku kontrolu, te niti jedna skupina u odnosu na prijevremene kontrole.

U resicama, statistički značajna razlika u ekspresiji SFRP1 postoji u svim patološkim posteljicama u odnosu na terminske kontrole, osim kod onih samo s gestacijskim dijabetesom. Nasuprot tome, niti jedna skupina se statistički značajno ne razlikuje od prijevremenih kontrola, osim skupine samo s gestacijskim dijabetesom gdje je ekspresija

SFRP1 manja u odnosu na prijevremene kontrole. Navedene rezultate smo izračunali uspoređujući odgovarajuće skupine pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom ($p < 0,05$).

Također smo međusobno usporedili skupine posteljica dobivene iz prijevremeno porođenih patoloških trudnoća.

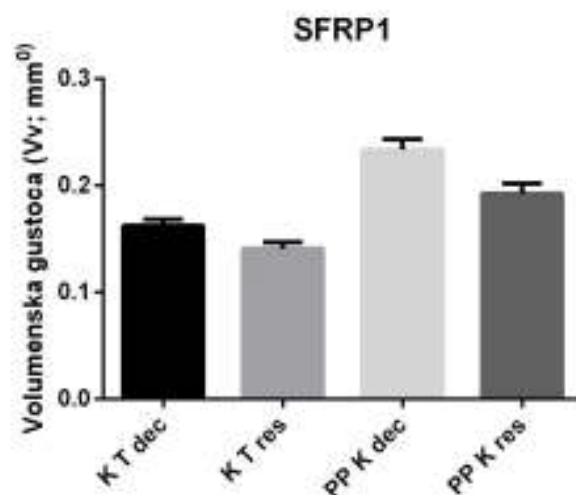
Najjače izražena ukupna ekspresija SFRP1 antigena nađena je u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom, Jednako tako, prijevremeno porođene posteljice s tlakom uz gestacijski dijabetes pokazale su najveću ekspresiju SFRP1 antigena i zasebno, u decidui i korionskim resicama. U resicama, najmanja izraženost SFRP1 nađena je u prijevremenim posteljicama samo s gestacijskim dijabetesom, i to statistički značajno manja u odnosu na prijevremene kontrole, a bez razlike u odnosu na terminske posteljice.

Uspoređujući ekspresiju SFRP1 u decidui u odnosu na ekspresiju u korionskim resicama u pojedinim skupinama posteljica, statistički značajnu razliku našli smo samo u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s gestacijskim dijabetesom ($p < 0,0001$), dok razlika u svim ostalim skupinama patoloških posteljica nije bila statistički značajna. U kontrolnim skupinama SFRP1 je jače izražen u decidui nego u korionskim resicama. Rezultate smo prikazali u Tablici 46 i na Slici 40.

Tablica 46. Usporedba ekspresije proteina SFRP1 u decidui s ekspresijom u korionskim resicama kontrolnih terminskih i prijevremeno porođenih posteljica te prijevremeno porođenih posteljica s gestacijskim dijabetesom.

	decidua	resice	p vrijednost
Kontrole terminske	0,1625±0,005954	0,1408±0,006168	0,0019
Kontrole prijevremene	0,2336±0,009558	0,1926±0,009558	0,0048
Gestacijski dijabetes (prijevremeni)	0,2320±0,009042	0,1418±0,007168	<0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 40. Ekspresija proteina SFRP1 u decidui i korionskim resicama terminskih kontrolnih posteljica te prijevremeno porođenih kontrolnih posteljica. (KT dec= terminske kontrole decidua; KT res= terminske kontrole resice; PPK dec prijevremene kontrole decidua; PP K res= prijevremene kontrole resice)

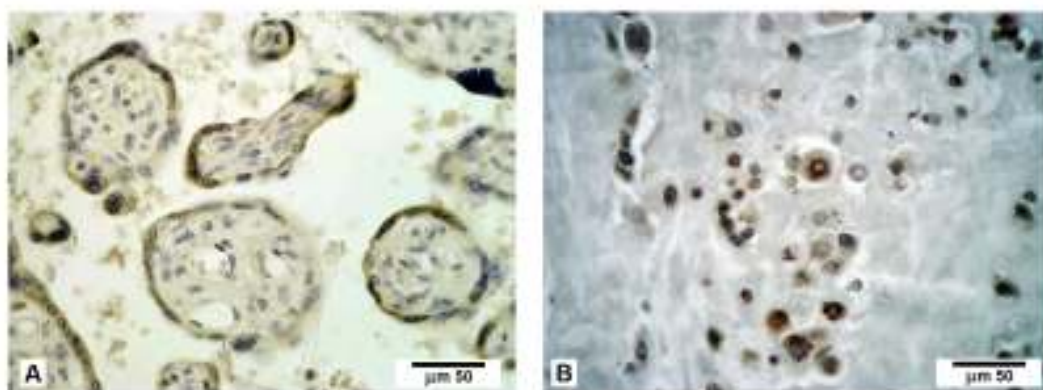
5.2. Ekspresija proteina SFRP3

Ekspresiju proteina SFRP3 istraživali smo u kontrolnim terminskim posteljicama i kontrolnim prijevremeno porođenim posteljicama te u posteljicama nakon terminskih odnosno prijevremeno porođenih patoloških trudnoća.

Zasebno smo analizirali slijedeća patološka stanja:

1. Terminski idiopatski IUGR
2. Idiopatski prijevremeno porođeni IUGR
3. IUGR uz povišen krvni tlak u prijevremenim porodima
4. Povišeni krvni tlak uz eutrofičnu djecu - terminski
5. Povišeni krvni tlak uz eutrofičnu djecu - prijevremeno porođeni
6. Prijevremeno porođeni s gestacijskim dijabetesom
7. Povišeni tlak uz gestacijsku šećernu bolest - terminski i prijevremeni
- 8..Anomalije ploda

U kontrolnim terminskim posteljicama ekspresiju proteina SFRP3 našli smo u citoplazmi sinciciotrofoblasta, Hofbauerovih stanica, viloznih stromalnih stanica, u stanicama ekstraviloznog intermedijarnog trofoblasta i u decidui (Slika 41).



Slika 41. Ekspresija proteina SFRP3 u korionskim resicama (A) i decidui (B) kontrolnih terminskih posteljica (DAB, kontrastirano hemalaunom)

5.2.1. Ekspresija proteina SFRP3 u patološkim terminskim i patološkim prijevremeno porođenim posteljicama

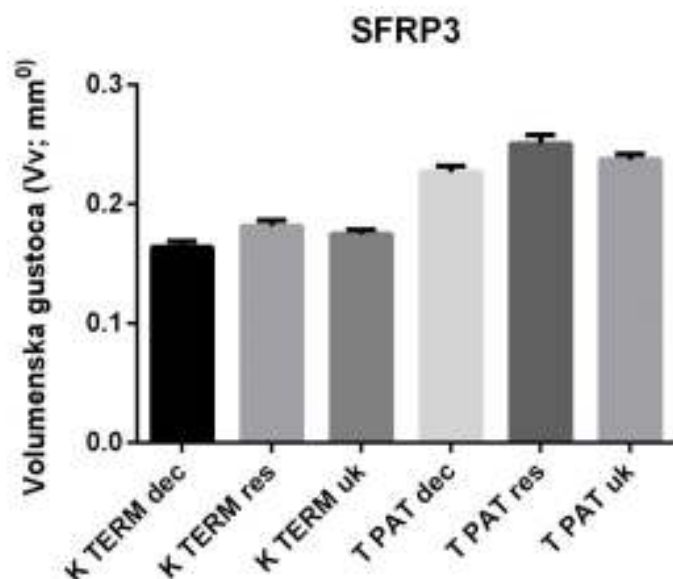
Usporedili smo ekspresiju proteina SFRP 3 u kontrolnim terminskim posteljicama (n= 25) s ekspresijom u terminskim posteljicama iz patoloških trudnoća (n= 57).

Ekspresiju SFRP1 proteina analizirali smo zasebno u deicidui i u korionskim resicama. Statistički značajno izraženiju ekspresiju ovog antigena izmjerili smo u terminskim posteljicama iz patoloških trudnoća u usporedbi s terminskim kontrolama kako u decidui tako i u korionskim resicama. Također smo usporedili cjelokupnu ekspresiju ovog proteina u obje skupine posteljica te dobili statistički značajno veću ekspresiju u patološkim posteljicama. Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kuskal Wallis ANOVA a post hoc testiranje je načinjeno Dunnovim post hoc testom. Rezultate smo prikazali u Tablici 47 i na Slici 42.

Tablica 47. Prikaz volumenske gustoće SFRP3 antigena (V_v, mm^0) u terminskim kontrolnim posteljicama i terminskim posteljicama iz patoloških trudnoća

Volumenska gustoća ($V_v; \text{mm}^0$)	Kontrola (terminska)	Terminske posteljice iz patoloških trudnoća	p vrijednost
Decidua	0,1636±0,005131	0.2265±0.005054	< 0,0001
Korionske resice	0,1813±0,005163	0.2503±0.007547	< 0.0001
Ukupna ekspresija	0,1747±0,003785	0.2370±0.004617	< 0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 42. Prikaz volumenske gustoće SFRP3 antigena (V_v, mm^0) u decidui i korionskim resicama te ukupna ekspresija u kontrolnim terminskim posteljicama i terminskim posteljicama iz patoloških trudnoća (K TERM dec=terminske kontrole decidua; K TERM res= terminske kontrole resice; K TERM uk= ukupna ekspresija u terminskim kontrolama; T PAT dec= terminska patologija decidua; T PAT res= terminska patologija resice; T PAT uk= ukupna ekspresija u terminskim patološkim posteljicama)

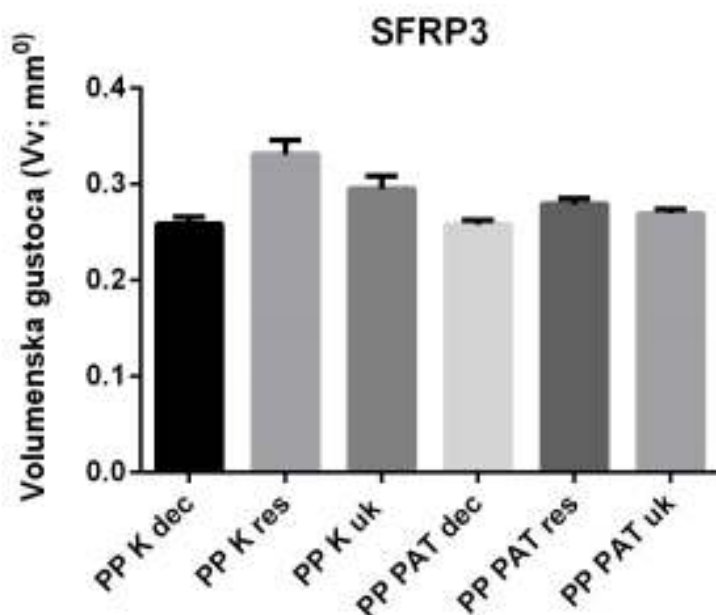
Jednako tako, usporedili smo kontrolne prijevremeno porođene posteljice ($n=8$) s prijevremeno porođenim posteljicama iz patoloških trudnoća ($n = 33$)

Nije bilo statistički značajne razlike u ukupnoj ekspresiji SFRP3 antigena između prijevremeno porođenih kontrolnih posteljica i prijevremenih posteljica iz patoloških trudnoća, kao niti razlike zasebno u decidui. U korionskim resicama ekspresija SFRP3 statistički je značajno veća u kontrolnim prijevremenim posteljicama. Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kuskal Wallis ANOVA a post hoc testiranje je načinjeno Dunnovim post hoc testom. Rezultate smo prikazali u Tablici 48 i na Slici 44.

Tablica 48. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui i korionskim resicama, te ukupne ekspresije u kontrolnim prijevremeno porođenim posteljicama s prijevremeno porođenim patološkim posteljicama

Volumenska gustoća (Vv; mm ⁰)	Kontrola (prijevremena)	Prijevremene patološke posteljice	p vrijednost
Decidua	0,2589±0,007025	0,2577±0,004901	ns
Korionske resice	0,3312±0,01490	0,2790±0,006167	0,0371
Ukupna ekspresija	0,2952±0,01355	0,2694±0,004539	ns

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne. (ns = >0,9999, nesignifikantno).



Slika 44. Prikaz volumenske gustoće SFRP3 antigena (Vv, mm⁰) u decidui i korionskim resicama te ukupna ekspresija u kontrolnim prijevremeno porođenim posteljicama i prijevremeno porođenim posteljicama iz patoloških trudnoća (PP K dec= prijevremene kontrole decidua; PP K res= prijevremene kontrole resice; PP K uk= ukupna ekspresija u prijevremenim kontrolama; PP PAT dec= prijevremena patologija decidua; PP PAT res= prijevremena patologija resice; PP PAT uk= ukupna ekspresija u prijevremenim patološkim posteljicama)

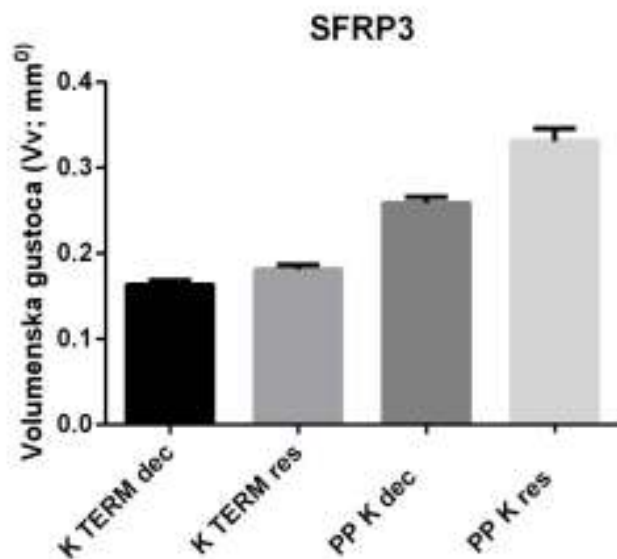
5.2.2. Ekspresija proteina SFRP3 u posteljicama kod prijevremenih poroda bez pridružene patologije (kontrolne prijevremeno porođene posteljice)

Ekspresija proteina SFRP3 bila je statistički značajno veća u posteljicama iz prijevremenih poroda u usporedbi s kontrolnim terminskim posteljicama (Kruskal Wallis ANOVA; $p < 0,05$). Pojedinačnom analizom proteinske ekspresije istog antigena, utvrdili smo da je SFRP3 jače izražen kako u decidui tako i u korionskim resicama prijevremeno porođenih posteljica. Ovu skupinu prijevremeno porođenih posteljica bez druge patologije koristili smo kao kontrolnu skupinu prijevremenih poroda. Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 49) i u obliku grafa (Slika 45 i 46).

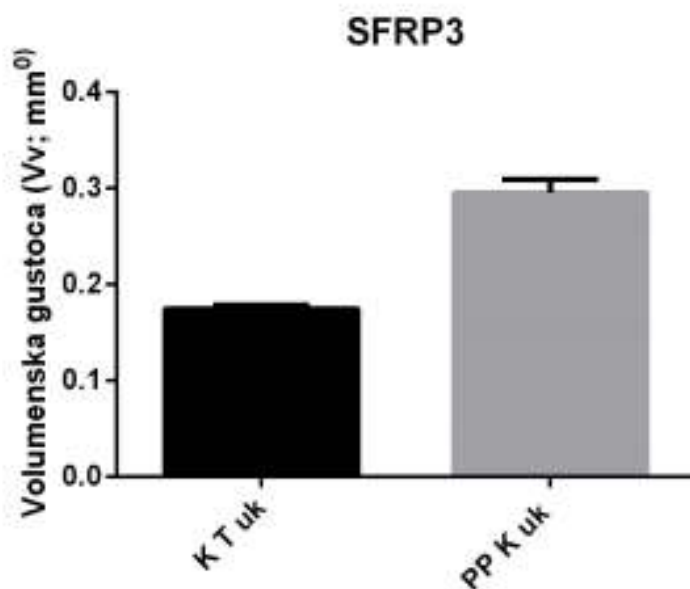
Tablica 49. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui i korionskim resicama, te ukupne ekspresije u normalnim prijevremeno porođenim posteljicama i normalnim terminskim posteljicama

Volumenska gustoća (Vv; mm ⁰)	Normalne (kontrolne) terminske posteljice	Normalne (kontrolne) prijevremeno porođene posteljice	p vrijednost
Decidua	0,1636±0,005131	0,2589±0,007025	0,0001
Korionske resice	0,1813±0,005163	0,3312±0,01490	<0,0001
Ukupna ekspresija	0,1747±0,003785	0,2952±0,01355	<0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 45. Prikaz volumenske gustoće SFRP3 antigena (Vv, mm⁰) u decidui i korionskim resicama normalnih posteljica kod prijevremenog poroda. Usporedba s terminskom kontrolnom skupinom. (K TERM dec= kontrola terminska decidua, K TERM res = kontrola terminska resice, PP K dec= prijevremeni porodi (prijevremene kontrole) decidua, PP K res= prijevremeni porodi (prijevremene kontrole) resice)



Slika 46. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP3 antigena (Vv, mm⁰) u normalnim posteljicama kod prijevremenog poroda (PP K uk). Usporedba s terminskom kontrolnom skupinom (K T uk).

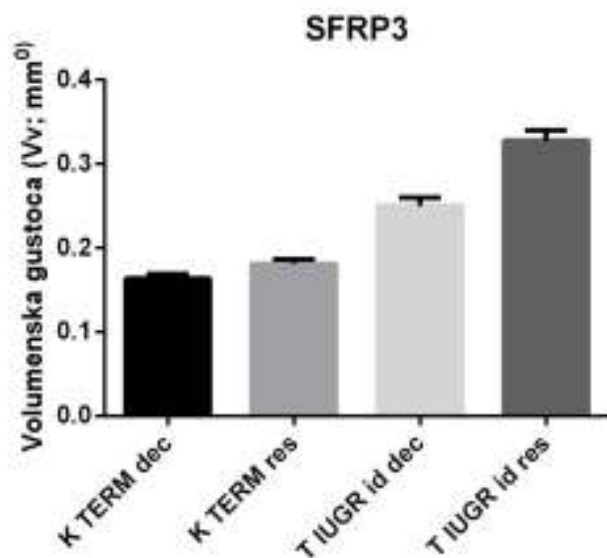
5.2.3. Ekspresija proteina SFRP3 u posteljicama kod terminskog idiopatskog IUGR-a

Ekspresija proteina SFRP3 bila je statistički značajno veća u posteljicama kod terminskog idiopatskog zastoja u rastu ploda u usporedbi s terminskim kontrolnim posteljicama (Kruskal Wallis ANOVA; $p < 0,05$). Također smo utvrdili da je ekspresija istog antigena jače izražena u korionskim resicama i decidui patoloških posteljica. Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 50) i u obliku grafa (Slika 47 i 48).

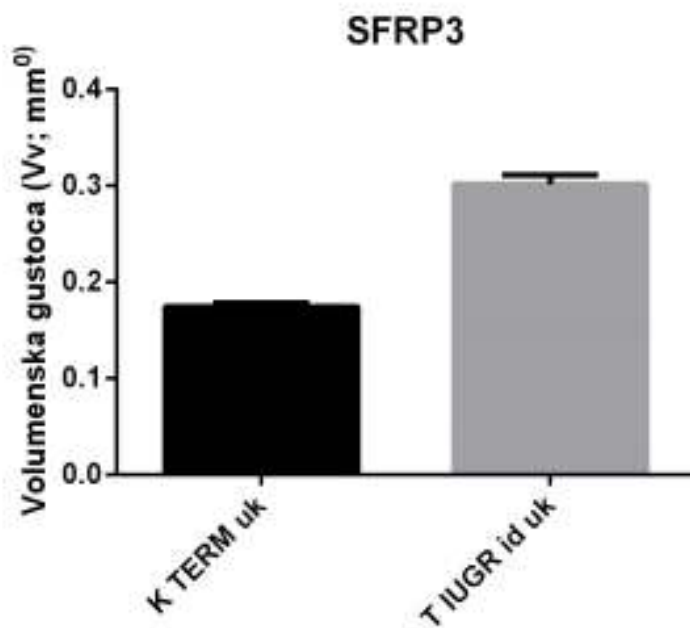
Tablica 50. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui i korionskim resicama, te ukupne ekspresije u terminskim posteljicama iz trudnoća s idiopatskim IUGR i terminskim kontrolnim posteljicama

Volumenska gustoća (Vv; mm ⁰)	Kontrola (terminska)	Terminski idiopatski IUGR	p vrijednost
Decidua	0,1636±0,005131	0,2501±0,009258	<0,0001
Korionske resice	0,1813±0,005163	0,3275±0,01248	<0,0001
Ukupna ekspresija	0,1747±0,003785	0,3014±0,009527	<0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

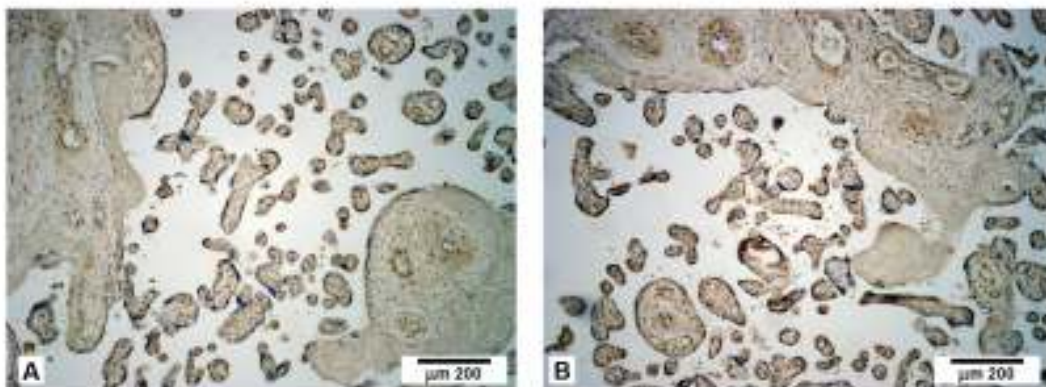


Slika 47. Prikaz volumenske gustoće SFRP3 antigena (Vv, mm⁰) u korionskim resicama i decidui terminskih posteljica iz trudnoća s idiopatskim zastojem u rastu ploda. Usporedba s terminskim kontrolama. (K TERM dec= kontrola terminska decidua, K TERM res = kontrola terminska resice, T IUGR id dec= terminski idiopatski IUGR decidua, T IUGR id res= terminski idiopatski IUGR resice)



Slika 48. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP3 antigena (Vv, mm⁰) u terminskim posteljicama s idiopatskim zastojem u rastu ploda (T IUGR id uk) i terminskim kontrolama (K TERM uk).

Ekspresiju proteina SFRP3 našli smo u citoplazmi sinciotrofoblasta, ekstraviloznog intermedijarnog trofoblasta i u decidui (Slika 49). SFRP3 antigen nađen je i u stancama glatkog mišića krvnih žila posteljica sa zastojem u rastu ploda.



Slika 49. Ekspresija proteina SFRP1 u posteljicama kod terminskog idiopatskog IUGR-a (DAB, kontrastirano hemalaunom)

5.2.4. Ekspresija proteina SFRP3 u posteljicama kod prijevremeno porođenog idiopatskog IUGR-a

Ekspresija proteina SFRP3 bila je statistički značajno veća u posteljicama kod terminskog idiopatskog zastoja u rastu ploda u usporedbi s terminskim kontrolnim posteljicama (Kruskal Wallis ANOVA; $p < 0,05$). Također smo utvrdili da je ekspresija istog antigena slabije izražena u korionskim resicama patoloških posteljica u usporedbi s prijevremenom kontrolnom skupinom, dok u decidui i ukupnoj ekspresiji nije bilo statistički značajne razlike. Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 51 i 52) i u obliku grafa (Slika 50 i 51).

Tablica 51. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui i korionskim resicama, te ukupne ekspresije u prijevremeno porođenim posteljicama s idiopatskim IUGR i terminskim kontrolnim posteljicama

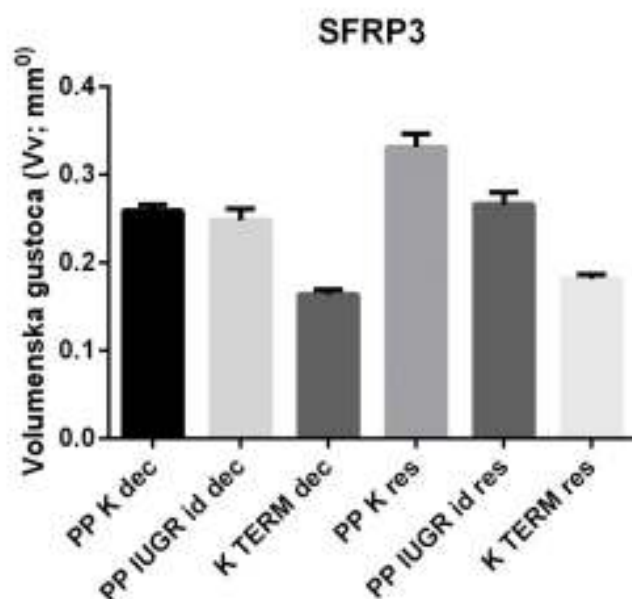
Volumenska gustoća (Vv; mm ⁰)	Kontrola (terminska)	Prijevremeno porođeni idiopatski IUGR	p vrijednost
Decidua	0,1636±0,005131	0,2482±0,01252	<0,0001
Korionske resice	0,1813±0,005163	0,2663±0,01309	<0,0001
Ukupna ekspresija	0,1747±0,003785	0,2540±0,009619	<0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

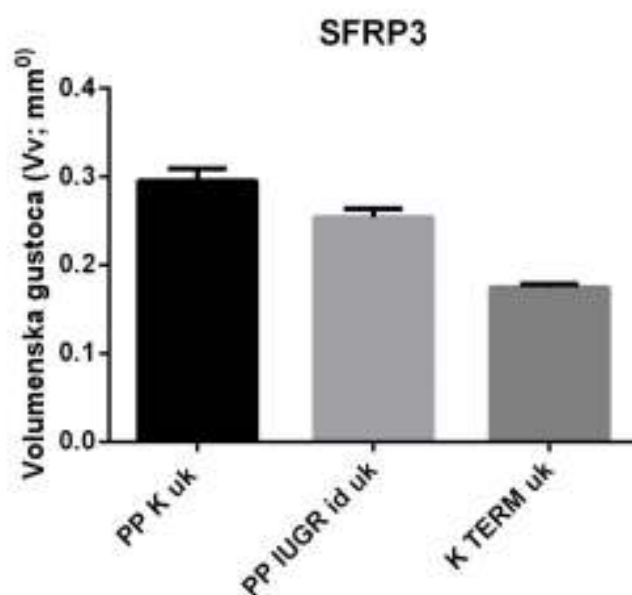
Tablica 52. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui i korionskim resicama, te ukupne ekspresije u prijevremeno porođenim posteljicama s idiopatskim IUGR i prijevremeno porođenim kontrolnim posteljicama

Volumenska gustoća (Vv; mm ⁰)	Kontrola (prijevremena)	Prijevremeno porođeni idiopatski IUGR	p vrijednost
Decidua	0,2589±0,007025	0,2482±0,01252	ns
Korionske resice	0,3312±0,01490	0,2663±0,01309	0,0123
Ukupna ekspresija	0,2952±0,01355	0,2540±0,009619	0.6466

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = >0,9999, nesignifikantno) Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 50. Prikaz volumenske gustoće SFRP3 antigena (V_v, mm^0) u korionskim resicama i decidui prijevremeno porođenih posteljica iz trudnoća s idiopatskim zastojem u rastu ploda. Usporedba s prijevremenim i terminskim kontrolama. (PP K dec = prijevremena kontrola decidua, PP IUGR id dec = prijevremeni idiopatski IUGR decidua, K TERM dec = kontrola terminska decidua, PP K res = prijevremena kontrola resice, PP IUGR id res = prijevremeni idiopatski IUGR resice, K TERM res = kontrola terminska resice)



Slika 51. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP3 antigena (V_v , mm^0) u prijevremeno porođenim posteljicama sidiopatskim zastojem u rastu ploda (PP IUGR id uk) i prijevremenim (PP K uk) i terminskim kontrolama (K TERM uk)

5.2.5. Ekspresija proteina SFRP3 u posteljicama kod prijevremenog poroda uz IUGR i povišeni krvni tlak majke

Ukupna ekspresija proteina SFRP3 kao i zasebna ekspresija u decidui i korionskim resicama bila je statistički značajno veća u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća sa zastojem u rastu ploda uz povišen krvni tlak u usporedbi s kontrolnim terminskim posteljicama ($p < 0,05$). Rezultati su dobiveni pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom.

Također smo utvrdili da nema statistički značajne razlike niti u ukupnoj niti u zasebnoj ekspresiji istog antigena u resicama i decidui u usporedbi s prijevremeno porođenim kontrolnim posteljicama. (Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. ; $p < 0,05$). Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 53 i 54) i u obliku grafa (Slika 52 i 53).

Tablica 53. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui i korionskim resicama, te ukupne ekspresije u prijevremeno porođenim posteljicama s IUGR uz povišeni tlak majke i terminskim kontrolnim posteljicama

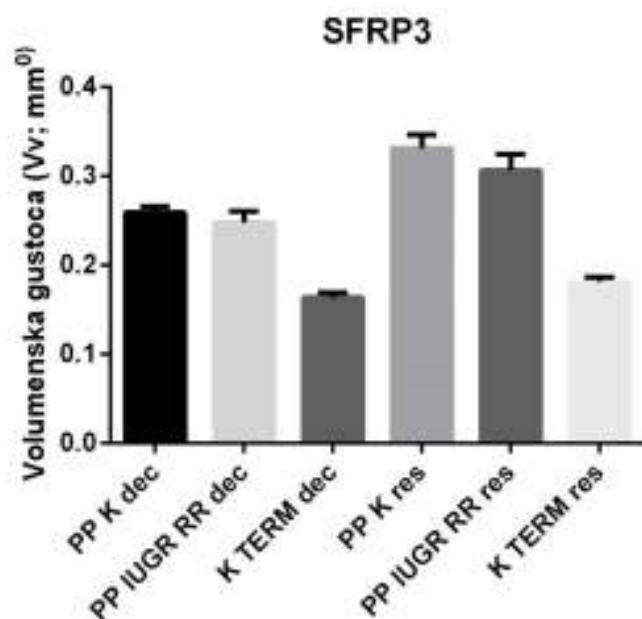
Volumenska gustoća (V_v ; mm^0)	Kontrola (termiska)	Prijevremeno porođeni IUGR uz povišeni tlak	p vrijednost
Decidua	0,1636±0,005131	0,2479±0,01226	<0,0001
Korionske resice	0,1813±0,005163	0,2827±0,01441	<0,0001
Ukupna ekspresija	0,1747±0,003785	0,2756±0,01173	<0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

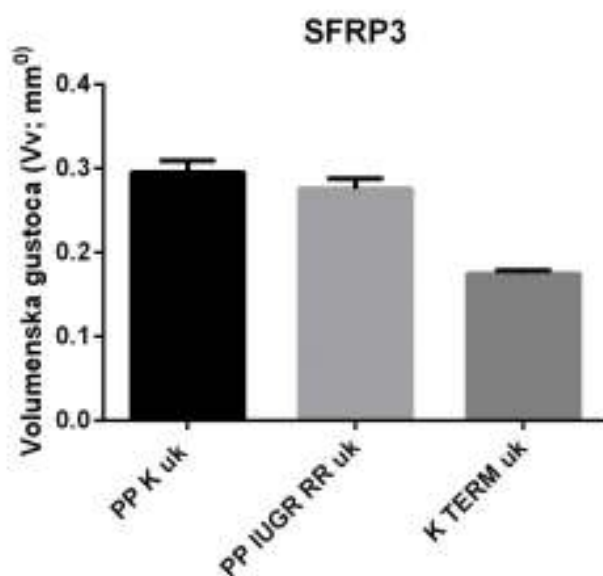
Tablica 54. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui i korionskim resicama, te ukupne ekspresije u prijevremeno porođenim posteljicama IUGR uz povišeni tlak majke i prijevremeno porođenim kontrolnim posteljicama

Volumenska gustoća (V_v ; mm^0)	Kontrola (prijevremena)	Prijevremeno porođeni IUGR uz povišeni tlak	p vrijednost
Decidua	0,2589±0,007025	0,2479±0,01226	ns
Korionske resice	0,3312±0,01490	0,2827±0,01441	ns
Ukupna ekspresija	0,2952±0,01355	0,2756±0,01173	ns

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = >0,9999, nesigifikantno)



Slika 52. Prikaz volumenske gustoće SFRP3 antigena (Vv, mm⁰) u korionskim resicama i decidui prijevremeno porođenih posteljica iz trudnoća sa zastojem u rastu ploda uz povišeni tlak majke. Usporedba s prijevremenim i terminskim kontrolama. (PP K dec = prijevremena kontrola decidua, PP IUGR RR dec = prijevremeni IUGR s tlakom decidua, K TERM dec = kontrola terminska decidua, PP K res = prijevremena kontrola resice, PP IUGR RR res = prijevremeni IUGR s tlakom resice, K TERM res = kontrola terminska resice)



Slika 53. Ukupna ekspresija SFRP3 antigena (V_v , mm^0) u prijevremeno porođenim posteljicama uz IUGR i povišen krvni tlak (PP IUGR RR uk). Usporedba s prijevremenim (PP K uk) i terminskim kontrolama (K TREM uk).

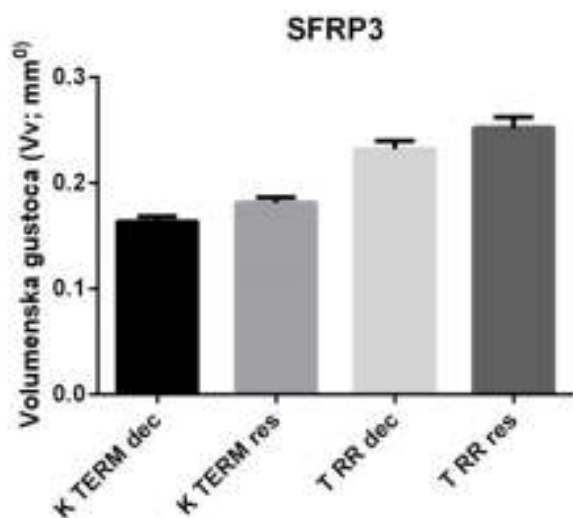
5.2.6. Ekspresija proteina SFRP3 u terminskim posteljicama kod povišenog krvnog tlaka uz eutrofičnu djecu

Ekspresija proteina SFRP3 bila je statistički značajno veća u terminskim posteljicama kod povišenoga krvnog tlaka bez zastoja u rastu ploda, dakle s eutrofičnom djecom, u usporedbi s terminskim kontrolnim posteljicama (Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom; $p < 0,05$). Pojedinačnom analizom proteinske ekspresije istog antigena, utvrdili smo da je SFRP3 jače izražen kako u decidui tako i u korionskim resicama patoloških posteljica. Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 55) i u obliku grafa (Slika 54 i 55).

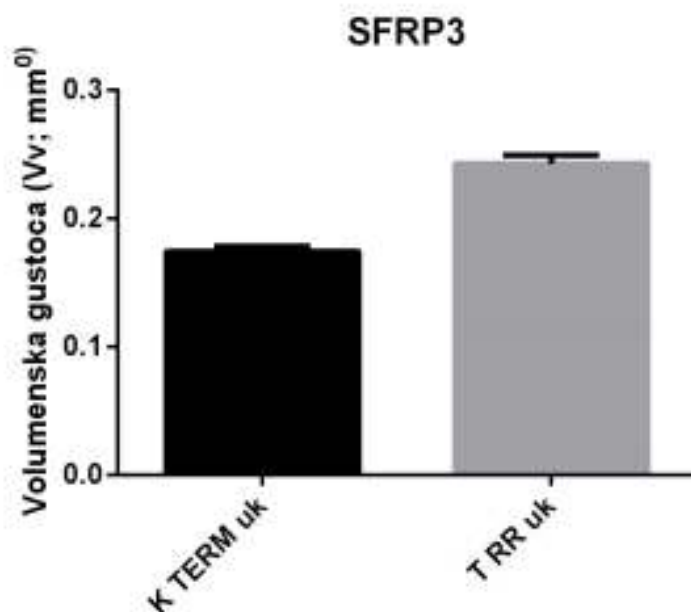
Tablica 55. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui i korionskim resicama, te ukupne ekspresije u terminskim posteljicama iz trudnoća s eutrofičnom djecom uz povišeni tlak majke i terminskim kontrolnim posteljicama

Volumenska gustoća (V_v ; mm^0)	Kontrola (terminska)	Prijevremeno porođeni IUGR uz povišeni tlak	p vrijednost
Decidua	$0,1636 \pm 0,005131$	$0,2323 \pm 0,007761$	<0,0001
Korionske resice	$0,1813 \pm 0,005163$	$0,2524 \pm 0,009885$	<0,0001
Ukupna ekspresija	$0,1747 \pm 0,003785$	$0,2430 \pm 0,006424$	<0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

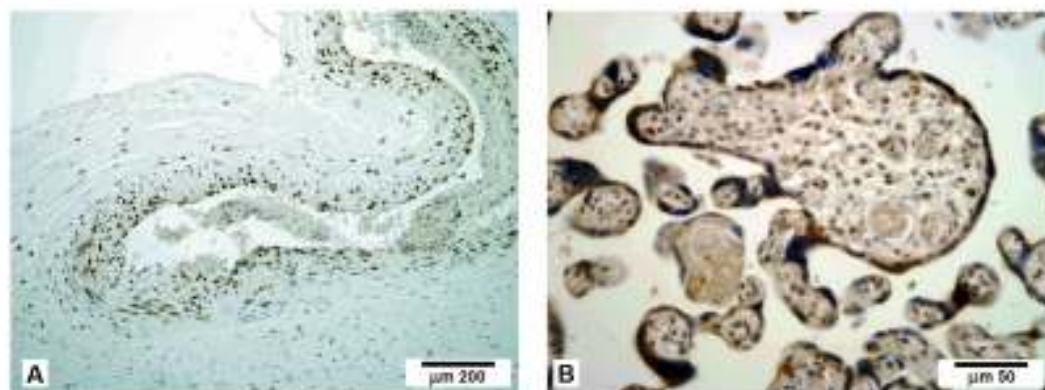


Slika 54. Prikaz volumenske gustoće SFRP3 antigena (V_v, mm^0) u decidui i korionskim resicama terminkih posteljica kod povišenog krvnog tlaka uz eutrofičnu djecu te terminskim kontrolama (K TERM dec = kontrola terminska decidua, K TERM res = kontrola terminska resice, T RR dec = terminski tlak decidua, T RR res = terminski tlak resice)



Slika 55. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP3 antigena (V_v, mm^0) u terminskim posteljicama kod povišenog krvnog tlaka uz eutrofičnu djecu (T RR uk) i terminskim kontrolama (K TERM uk)

Ekspresiju proteina SFRP3 našli smo u citoplazmi sinciotrofoblasta, citotrofoblasta i u decidui terminskih posteljica iz trudnoća s povišenim tlakom majke (Slika 50).



Slika 56. Ekspresija proteina SFRP3 u terminskim posteljicama kod povišenog krvnog tlaka majke uz normalnu težinu djeteta (DAB, kontrastirano hemalaunom).

5.2.7. Ekspresija proteina SFRP3 u prijevremeno porođenim posteljicama kod povišenog krvnog tlaka uz djecu eutrofičnu za gestacijsku dob, spol i paritet majke

Ekspresija proteina SFRP3 bila je statistički značajno veća u prijevremeno porođenim posteljicama kod povišenoga krvnog tlaka bez zastoja u rastu ploda, dakle s eutrofičnom djecom za gestacijsku dob, spol i paritet majke, u usporedbi s terminskim kontrolnim posteljicama. Rezultati su analizirani pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. ($p < 0,05$). Pojedinačnom analizom proteinske ekspresije istog antigena, utvrdili smo da je SFRP3 jače izražen kako u decidui tako i u korionskim resicama patoloških posteljica. Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 56) i u obliku grafa (Slika 57 i 58).

Uspoređujući patološku skupinu prijevremeno porođenih posteljica s prijevremenim kontrolama, nije nađena statistički značajna razlika u decidui niti u ukupnoj ekspresiji SFRP 3 proteina. Jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) statistički značajna razlika između prijevremeno porođenih kontrola i ispitivane skupine prijevremeno porođenih posteljica iz trudnoća s povišenim tlakom majke i eutrofičnom djecom nađena je u korionskim resicama patoloških posteljica, u kojima je izraženost antigena manja nego u kontrolnoj skupini. Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 57) i u obliku grafa (Slika 57 i 58).

Tablica 56. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui i korionskim resicama, te ukupne ekspresije u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s eutrofičnom djecom uz povišeni tlak majke i terminskim kontrolnim posteljicama

Volumenska gustoća (Vv; mm ⁰)	Kontrola (termiska)	Prijevremeno porođeni eutrofični uz povišeni tlak	p vrijednost
Decidua	0,1636±0,005131	0,2572±0,01072	<0,0001
Korionske resice	0,1813±0,005163	0,2644±0,0129	0,0005
Ukupna ekspresija	0,1747±0,003785	0,2611±0,008878	<0,0001

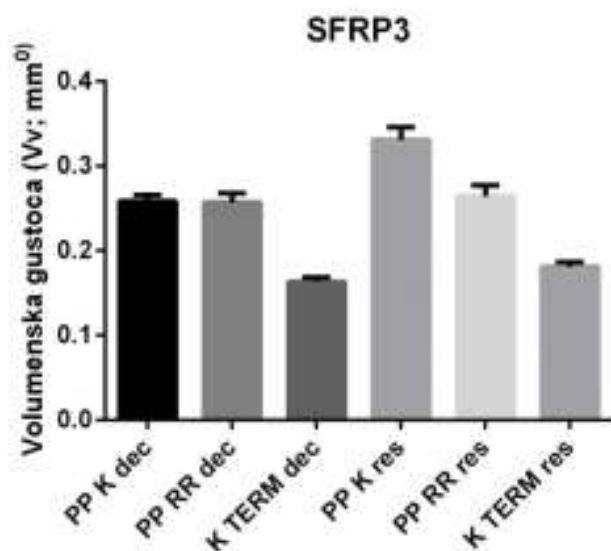
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Tablica 57. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui i korionskim resicama, te ukupne ekspresije u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s eutrofičnom djecom uz povišeni tlak majke i prijevremeno porođenim kontrolnim posteljicama

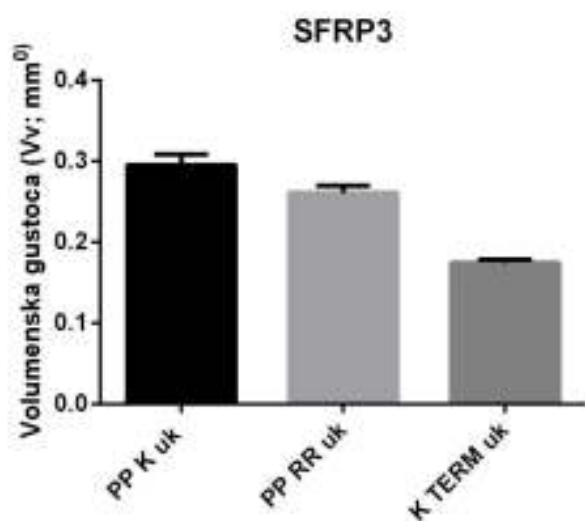
Volumenska gustoća	Kontrola	Prijevremeno porođeni	p vrijednost
--------------------	----------	-----------------------	--------------

(Vv; mm ⁰)	(prijevremena)	eutrofični uz povišeni tlak	
Decidua	0,2589±0,007025	0,2572±0,01072	ns
Korionske resice	0,3312±0,01490	0,2644±0,0129	0,0317
Ukupna ekspresija	0,2952±0,01355	0,2611±0,008878	ns

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = $> 0,9999$, nesignifikantno) Podebljane vrijednosti su značajne.



Slika 57. Prikaz volumenske gustoće SFRP3 antigena (Vv, mm⁰) u decidui i korionskim resicama prijevremeno porođenih posteljica eutrofične djece uz povišeni tlak majke i prijevremenim i terminskim kontrolama (PP K dec = prijevremena kontrola decidua, PP RR dec = prijevremeni tlak decidua, K TERM dec = kontrola terminska decidua, PP K res = prijevremena kontrola resice, PP RR res = prijevremeno porođeni tlak resice, K TERM res = kontrola terminska resice)



Slika 58. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP3 antigena (V_v , mm^0) u prijevremeno porođenim posteljicama kod eutrofične djece i povišenog tlaka majke te prijevremenim i terminskim kontrolama

5.2.8. Ekspresija proteina SFRP3 u prijevremeno porođenim posteljicama s gestacijskom šećernom bolesti

Ekspresija proteina SFRP3 bila je statistički značajno veća u prijevremeno porođenim posteljicama s gestacijskim dijabetesom u usporedbi s kontrolnim terminskim posteljicama (Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom; $p < 0,05$). Pojedinačnom analizom proteinske ekspresije istog antigena, utvrdili smo da je SFRP3 jače izražen kako u decidui tako i u korionskim resicama patoloških posteljica. Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 58) i u obliku grafa (Slika 59 i 60).

Uspoređujući patološku skupinu prijevremeno porođenih posteljica s prijevremenim kontrolama, nije nađena statistički značajna razlika u decidui i ukupnoj ekspresiji SFRP3 dok je u resicama razlika statistički značajna, no ekspresija SFRP3 proteina je manja nego u resicama kontrolne prijevremeno porođene skupine. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 59) i u obliku grafa (Slika 59 i 60).

Tablica 58. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui i korionskim resicama, te ukupne ekspresije u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s gestacijskim dijabetesom s terminskim kontrolnim posteljicama

Volumenska gustoća (V_v ; mm^0)	Kontrola (terminska)	Prijevremeno porođeni s gestacijskim dijabetesom	p vrijednost
Decidua	0,1636±0,005131	0,2526±0,009671	<0,0001
Korionske resice	0,1813±0,005163	0,2721±0,01170	<0,0001
Ukupna ekspresija	0,1747±0,003785	0,2726±0,01151	<0,0001

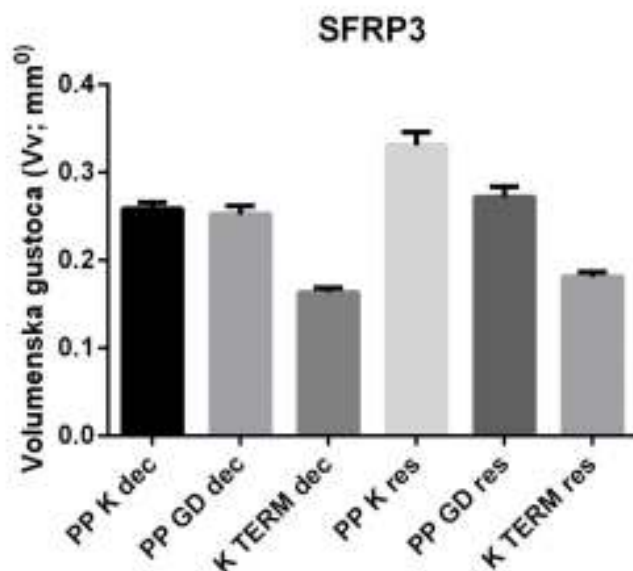
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Tablica 59. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui i korionskim resicama, te ukupne ekspresije u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s gestacijskim dijabetesom s prijevremeno porođenim kontrolnim posteljicama

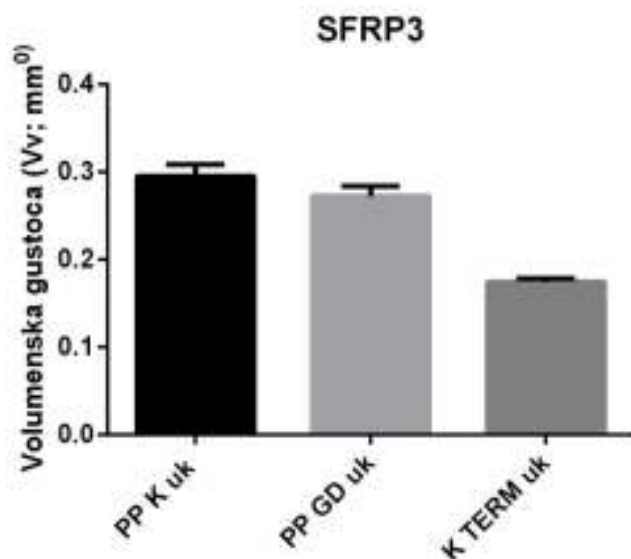
Volumenska gustoća (V_v ; mm^0)	Kontrola (prijevremena)	Prijevremeno porođeni s gestacijskim dijabetesom	p vrijednost
--	-------------------------	--	--------------

Decidua	0,2589±0,007025	0,2572±0,01072	ns
Korionske resice	0,3312±0,01490	0,2644±0,0129	0,0259
Ukupna ekspresija	0,2952±0,01355	0,2611±0,008878	ns

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = $> 0,9999$, nesignifikantno) Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 59. Prikaz volumenske gustoće SFRP3 antigena (V_v, mm^0) u decidui i korionskim resicama prijevremeno porođenih posteljica uz gestacijski dijabetes majke te prijevremenim i terminskim kontrolama (PP K dec = prijevremena kontrola decidua, PP GD dec = prijevremeni gestacijski dijabetes decidua, K TERM dec = kontrola terminska decidua, PP K res = prijevremena kontrola resice, PP GD res = prijevremeno porođeni gestacijski dijabetes resice, K TERM res = kontrola terminska resice)



Slika 60. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP3 antigena (V_v , mm^0) u prijevremeno porođenim posteljicama uz gestacijski dijabetes majke (PP GD uk) te prijevremenim (PP K uk) i terminskim kontrolama (K TERM uk)

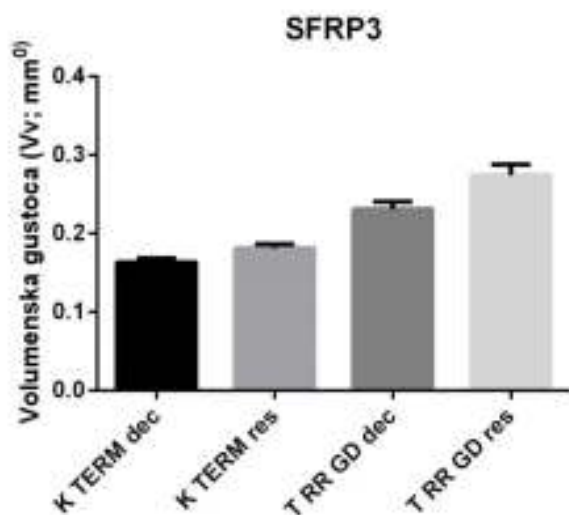
5.2.9. Ekspresija proteina SFRP3 u terminskim posteljicama iz trudnoća s povišenim krvnim tlakom i gestacijskim dijabetesom

Ekspresija proteina SFRP3 bila je statistički značajno veća u terminskim posteljicama iz trudnoća uz povišeni krvni tlak s gestacijskom šećernom bolesti u usporedbi s terminskim kontrolnim posteljicama (Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom; $p < 0,05$). Pojedinačnom analizom proteinske ekspresije istog antigena, utvrdili smo da je SFRP3 jače izražen kako u decidui tako i u korionskim resicama terminskih patoloških posteljica. Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 60) i u obliku grafa (Slika 61 i 62).

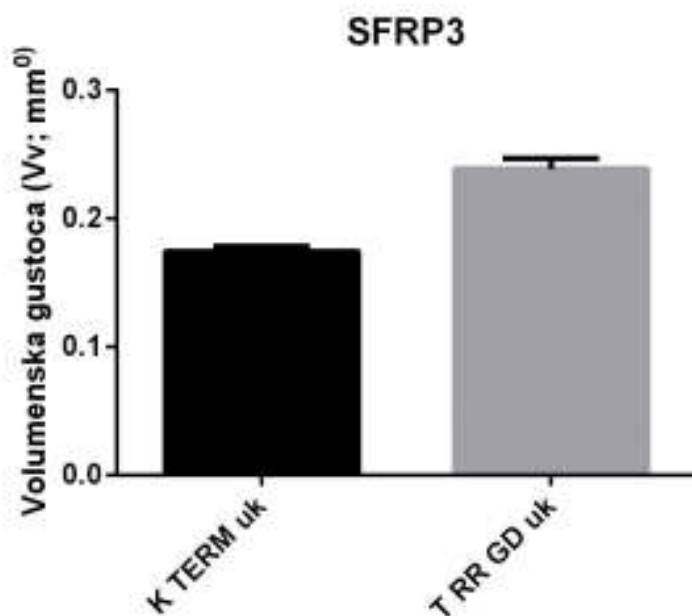
Tablica 60. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui i korionskim resicama, te ukupne ekspresije u terminskim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom s terminskim kontrolnim posteljicama

Volumenska gustoća (V_v ; mm^0)	Kontrola (terminska)	Povišeni tlak i gestacijski dijabetes (terminski)	p vrijednost
Decidua	0,1636±0,005131	0,2311±0,009297	<0,0001
Korionske resice	0,1813±0,005163	0,2746±0,01336	<0,0001
Ukupna ekspresija	0,1747±0,003785	0,2389±0,008258	<0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) Analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

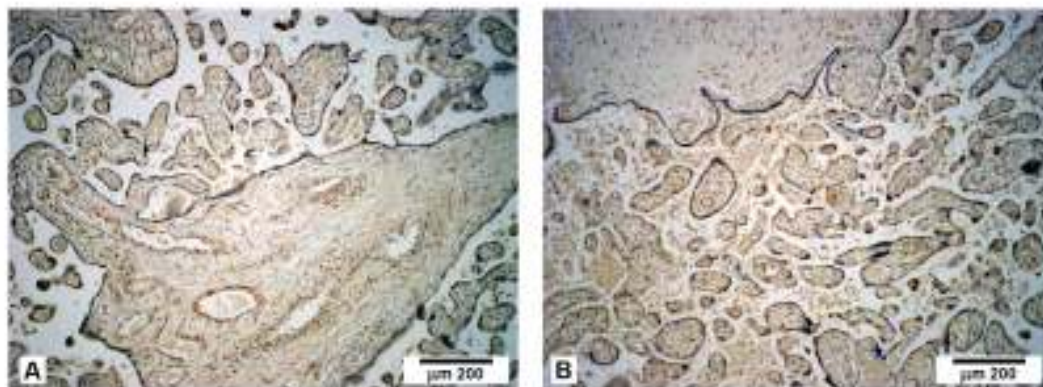


Slika 61. Prikaz volumenske gustoće SFRP3 antigena (Vv, mm⁰) u decidui i korionskim resicama terminskih posteljica eutrofične djece iz trudnoća s povišenim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom te u terminskim kontrolama (K TERM dec = kontrola terminska decidua, K TERM res = kontrola terminska resice, T RR GD dec = terminski tlak s gestacijskim dijabetesom decidua, T RR GD res = terminski tlak s gestacijskim dijabetesom resice)



Slika 62. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP3 antigena (Vv, mm⁰) u terminskim posteljicama eutrofične djece iz trudnoća s povišenim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom (T RR GD uk) te u terminskim kontrolama (K TERM uk)

Ekspresiju proteina SFRP3 našli smo u citoplazmi sinciotrofoblasta, citotrofoblasta i u decidui terminskih posteljica s povišenim tlakom i gestacijskim dijabetesom majke (Slika 63).



Slika 63. Ekspresija proteina SFRP3 u terminskim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom i gestacijskim dijabetesom majke (DAB, kontrastirano hemalaunom)

5.2.10. Ekspresija proteina SFRP3 u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim krvnim tlakom i gestacijskim dijabetesom

Ekspresija proteina SFRP3 bila je statistički značajno veća u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća uz povišeni krvni tlak s gestacijskom šećernom bolesti u usporedbi s terminskim kontrolnim posteljicama (Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom; $p < 0,05$). Pojedinačnom analizom proteinske ekspresije istog antigena, utvrdili smo da je SFRP3 jače izražen u decidui prijevremeno porođenih patoloških posteljica. Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 61) i u obliku grafa (Slika 64).

Uspoređujući s kontrolnom skupinom prijevremeno porođenih posteljica, nije bilo statistički značajne razlike niti u ukupnoj ekspresiji SFRP3 proteina kao niti u decidui u odnosu na patološke posteljice (Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom; $p < 0,05$). Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 62) i u obliku grafa (Slika 64).

Tablica 61. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui i ukupne ekspresije u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom s terminskim kontrolnim posteljicama

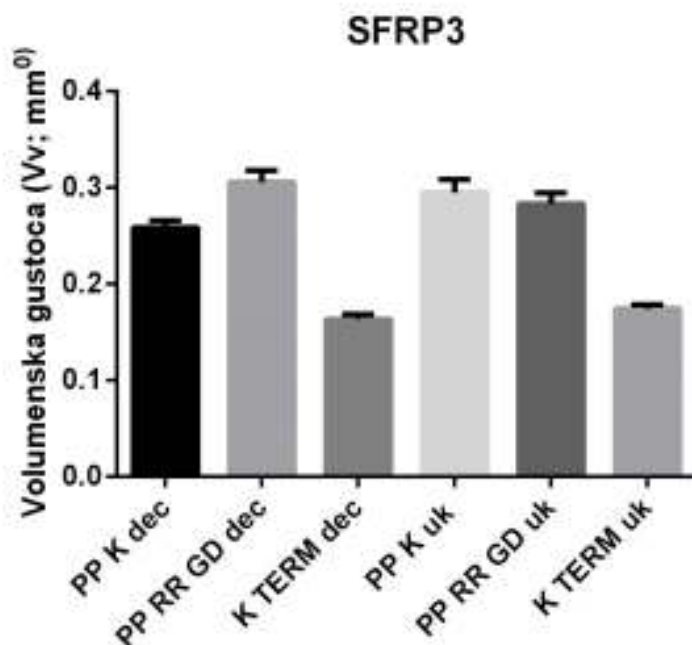
Volumenska gustoća (Vv; mm ⁰)	Kontrola (terminska)	Povišeni tlak i gestacijski dijabetes (prijevremeni)	p vrijednost
Decidua	0,1636±0,005131	0,3059±0,01201	<0,0001
Ukupna ekspresija	0,1747±0,003785	0,2832±0,01119	<0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Tablica 62. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui i ukupne ekspresije u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom s prijevremenim kontrolnim posteljicama

Volumenska gustoća (Vv; mm ⁰)	Kontrola (prijevremena)	Povišeni tlak i gestacijski dijabetes (prijevremeni)	p vrijednost
Decidua	0,2589±0,007025	0,3059±0,01201	ns
Ukupna ekspresija	0,2952±0,01355	0,2832±0,01119	ns

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = >0,9999, nesigifikantno)



Slika 64. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP3 antigena (V_v , mm^0) i V_v u decidui prijevremeno porođenih posteljica eutrofične djece iz trudnoća s povišenim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom te u terminskim i prijevremenim kontrolama (PP K dec = prijevremen kontrola decidua, PP RR GD dec = prijevremeni tlak s gestacijskim dijabetesom decidua, K TERM dec = kontrola terminska decidua, PP K uk = prijevremene kontrole ukupna ekspresija, PP RR GD uk = prijevremeni tlak s gestacijskim dijabetesom ukupna ekspresija, K TERM uk = kontrola terminska ukupna ekspresija)

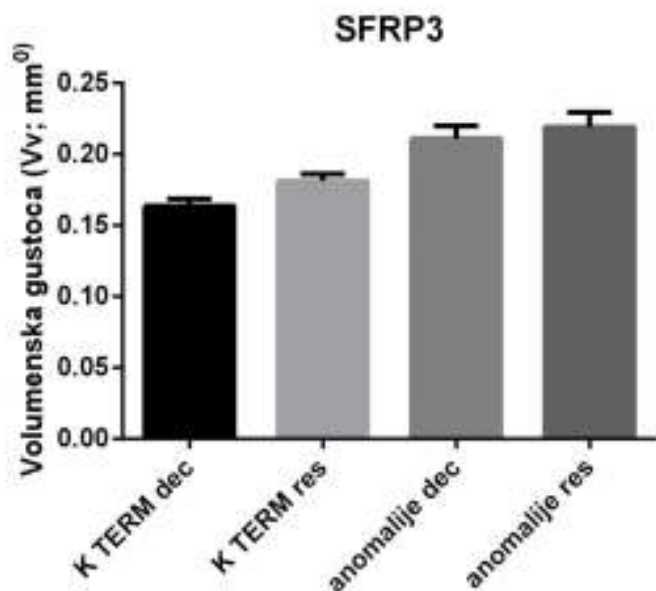
5.2.11. Ekspresija proteina SFRP3 u posteljicama kod anomalija ploda

Ukupna ekspresija proteina SFRP3 bila je statistički značajno veća u posteljicama kod anomalija ploda u usporedbi s kontrolnim posteljicama (Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom; $p < 0,05$). U decidui i korionskim resicama patoloških posteljica ekspresija istog antigena bila je također značajno veća. Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 63) i u obliku grafa (Slika 65 i 66).

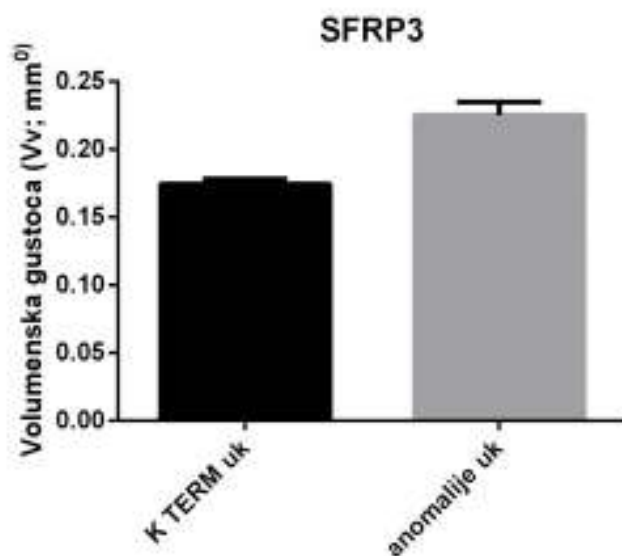
Tablica 63. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui te ukupne ekspresije u posteljicama iz trudnoća s anomalijom ploda s terminskim kontrolnim posteljicama

Volumenska gustoća (Vv; mm ⁰)	Kontrola (terminska)	Anomalije (terminske)	p vrijednost
Decidua	0,1636±0,005131	0,2111±0,008906	0,0008
Korionske resice	0,1813±0,005163	0,2192±0,01028	0,0007
Ukupna ekspresija	0,1747±0,003785	0,2253±0,009767	<0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

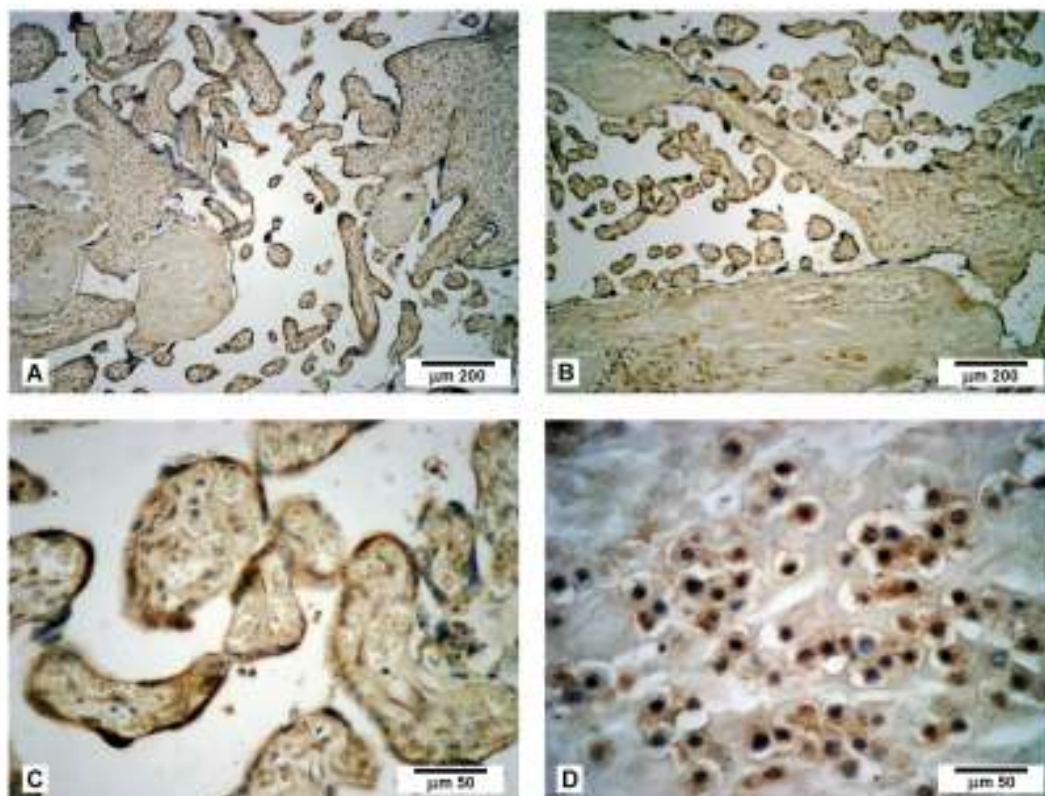


Slika 65. Prikaz volumenske gustoće SFRP3 antigena (Vv, mm⁰) u decidui i korionskim resicama posteljica kod anomalija ploda i terminskim kontrolama (K TERM dec = kontrola terminska decidua, K TERM res = kontrola terminska resice, anomalije dec = anomalije decidua, anomalije res = anomalije resice)



Slika 66. Prikaz ukupne volumenske gustoće SFRP3 antigena (Vv, mm⁰) u posteljicama kod anomalija ploda i terminskim kontrolama (K TERM uk = kontrola terminska ukupna ekspresija, anomalije uk = anomalije ukupna ekspresija)

Ekspresija proteina SFRP3 nađena je u citoplazmi sinciciotrofoblasta i citotrofoblasta u korionskim resicama i decidui posteljica kod anomalija ploda (Slika 67).



Slika 61. Ekspresija proteina SFRP3 u korionskim resicama (A, C) i decidui (B, C) posteljica kod anomalija ploda (DAB, kontrastirano hemalaunom)

5.2.12. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u terminskim patološkim posteljicama s terminskim i prijevremenim kontrolama

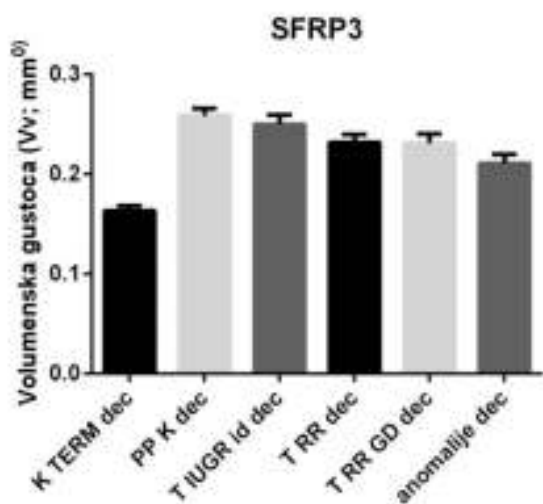
Analizirajući rezultate zamijetili smo sličnost ekspresije SFRP3 proteina u terminskim patološkim posteljicama s ekspresijom u prijevremenim kontrolnim posteljicama. Stoga smo usporedili međusobno terminsku patologiju s terminskim i prijevremenim kontrolama i to zasebno u deicidui i korionskim resicama, kao i ukupno u posteljici. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa analizirane su pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom; $p < 0,05$)

Rezultate smo prikazali u Tablici 64, 65 i 66 i Slikama 68, 69 i 70.

Tablica 64. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui terminskih patoloških posteljica s terminskim i prijevremenim kontrolama

decidua	Kontrole (terminske) p vrijednost	Kontrole (prijevremene) p vrijednost
Terminski idiopatski IUGR	< 0,0001	ns
Terminski tlak	< 0,0001	ns
Terminski tlak i dijabetes	< 0,0001	ns
Anomalije	0,0008	0,6474

Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = $p > 0,9999$, nesigifikantno) Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

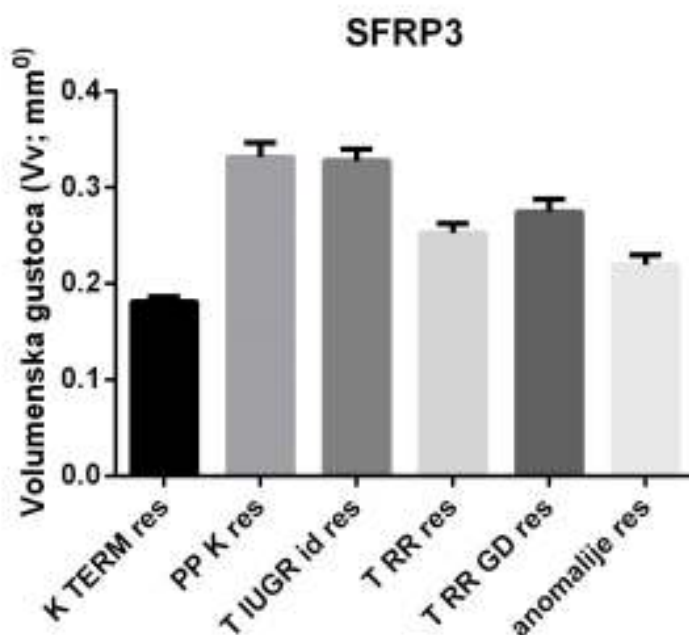


Slika 68. Prikaz ekspresije proteina SFRP3 u decidui terminskih patoloških posteljica s terminskim i prijevremenim kontrolama, (K TERM dec = kontrola terminska decidua, PP K dec = prijevremena kontrola decidua, T IUGR id dec = terminski idiopatski IUGR decidua, T RR dec = terminski tlak decidua, T RR GD dec = terminski tlak s gestacijskim dijabetesom decidua, anomalije dec = anomalije decidua)

Tablica 65. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u korionskim resicama terminskih patoloških posteljica s terminskim i prijevremenim kontrolama

Korionske resice	Kontrole (terminske) p vrijednost	Kontrole (prijevremene) p vrijednost
Terminski idiopatski IUGR	< 0,0001	ns
Terminski tlak	< 0,0001	0,0006
Terminski tlak i dijabetes	<0,0001	0,14
Anomalije	0,0007	0,0001

Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = $p > 0,9999$, nesignifikantno) Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

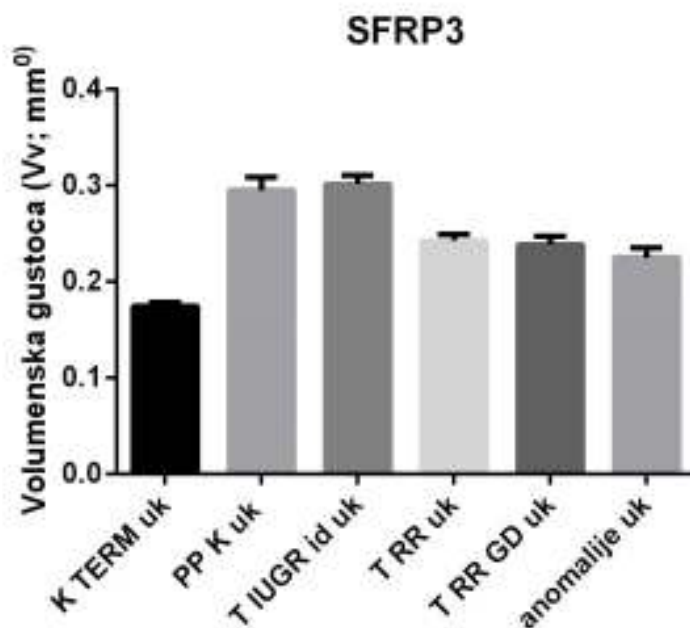


Slika 69. Prikaz ekspresije proteina SFRP3 u korionskim resicama terminskih patoloških posteljica s terminskim i prijevremenim kontrolama (K TERM res = kontrola terminska resice, PP K res = prijevremena kontrola resice, T IUGR id res = terminski idiopatski IUGR resice, T RR res = terminski tlak resice, T RR GD res = terminski tlak s gestacijskim dijabetesom resice, anomalije res = anomalije resice)

Tablica 66. Usporedba ukupne ekspresije proteina SFRP3 u terminskim patološkim posteljicama s terminskim i prijevremenim kontrolama

Ukupna ekspresija	Kontrole (terminske) p vrijednost	Kontrole (prijevremene) p vrijednost
Terminski idiopatski IUGR	< 0,0001	0,9869
Terminski tlak	< 0,0001	0,0037
Terminski tlak i dijabetes	<0,0001	0,0056
Anomalije	<0,0001	0,0002

Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunn's testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 70. Prikaz ukupne ekspresije proteina SFRP3 u terminskim patološkim posteljicama s terminskim i prijevremenim kontrolama (K TERM uk = kontrola terminska ukupna ekspresija, PP K uk = prijevremena kontrola ukupna ekspresija, T IUGR id uk = terminski idiopatski IUGR ukupna ekspresija, T RR uk = terminski tlak ukupna ekspresija, T RR GD uk = terminski tlak s gestacijskim dijabetesom ukupna ekspresija, anomalije uk = anomalije ukupna ekspresija)

Statistički značajno izraženiju ukupnu ekspresiju SFRP3 antigena kao i statistički značajniju ekspresiju zasebno u decidui i korionskim resicama izmjerili smo u svim ispitivanim skupinama patoloških terminskih posteljica u odnosu na kontrolnu skupinu terminskih posteljica. Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom i prikazali na Slikama 68, 69 i 70.

Uspoređujući skupine terminskih patoloških posteljica s kontrolnom skupinom prijevremeno porođenih posteljica, nismo našli statistički značajno različitu ekspresiju SFRP3 antigena u decidui niti u jednoj patološkoj skupini u odnosu na kontrolne prijevremeno porođene posteljice. U korionskim resicama, statistički značajno manja ekspresija SFRP3 nađena je u posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom majke i anomalijama ploda, dok kod idiopatskog zastoja u rastu i povišenog tlaka majke nije bilo statistički značajne razlike. Ukupna ekspresija statistički je značajno manja u trudnoćama s

povišenim tlakom, povišenim tlakom i gestacijskim dijabetesom te kod anomalija, dok u skupini idiopatskog zastoja u rastu nije bilo razlike. Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom i prikazali na Slikama 68, 69 i 70.

Također smo međusobno usporedili skupine posteljica dobivene iz patoloških trudnoća. Pomoću Kruskal Wallis ANOVA među njima nismo dobili statistički značajnu razliku u decidui niti u ukupnoj ekspresiji SFRP3 antigena, dok je u resicama nađena razlika između idiopatskog IUGR kod kojeg je ekspresija najveća i otalih patoloških trudnoća koje se međusobno statistički ne razlikuju ($p < 0,05$).

5.2.13. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u prijevremeno porođenim patološkim posteljicama s terminskim i prijevremenim kontrolama

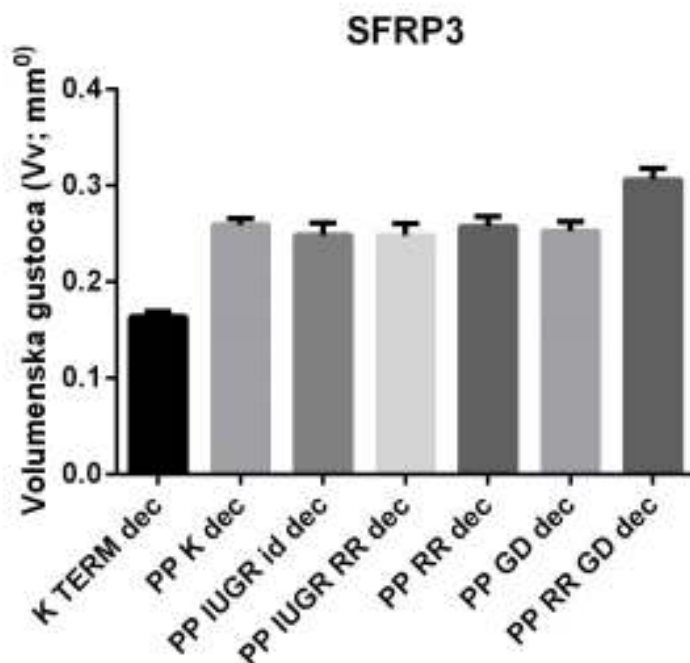
Ekspresiju SFRP3 proteina analizirali smo zasebno u decidui i u korionskim resicama, kao i ukupnu ekspresiju u posteljici, te usporedili međusobno prijevremeno porođenu patologiju s terminskim i prijevremenim kontrolama.

Rezultate smo prikazali u Tablici 67, 8 i 69 i Slikama 71, 72 i 73.

Tablica 67. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui prijevremeno porođenih patoloških posteljica s terminskim i prijevremenim kontrolama

decdua	Kontrole (terminske) p vrijednost	Kontrole (prijevremene) p vrijednost
Prijevremeni idiopatski IUGR	< 0,0001	ns
Prijevremni IUGR s tlakom	< 0,0001	ns
Prijevremeni tlak	< 0,0001	ns
Prijevremeni dijabetes	< 0,0001	ns
Prijevremeni tlak i dijabetes	< 0,0001	ns

Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = $p > 0,9999$, nesignifikantno) Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

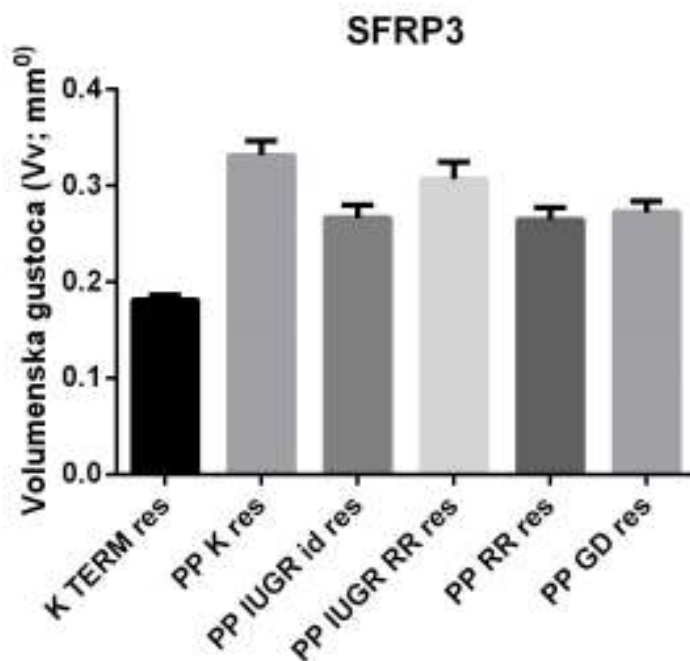


Slika 71. Prikaz ekspresije proteina SFRP3 u decidui prijevremeno porođenih patoloških posteljica te terminskih i prijevremenih kontrola (K TERM dec = kontrola terminska decidua, PP K dec = prijevremena kontrola decidua, PP IUGR id dec = prijevremeni idiopatski IUGR decidua, PP IUGR RR dec = prijevremeni IUGR s povišenim tlakom decidua, PP RR dec = prijevremeni povišeni tlak decidua, PP GD dec = prijevremeni gestacijski dijabetes dec, PP RR GD dec = prijevremeni tlak s gestacijskim dijabetesom decidua)

Tablica 68. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u korionskim resicama prijevremeno porođenih patoloških posteljica s terminskim i prijevremenim kontrolama

Korionske resice	Kontrole (terminske) p vrijednost	Kontrole (prijevremene) p vrijednost
Prijevremeni idiopatski IUGR	< 0,0001	0,0123
Prijevremeni IUGR s tlakom	< 0,0001	ns
Prijevremeni tlak	0,0005	0,0317
Prijevremeni dijabetes	<0,0001	0,0259

Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = $p > 0,9999$, nesignifikantno) Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

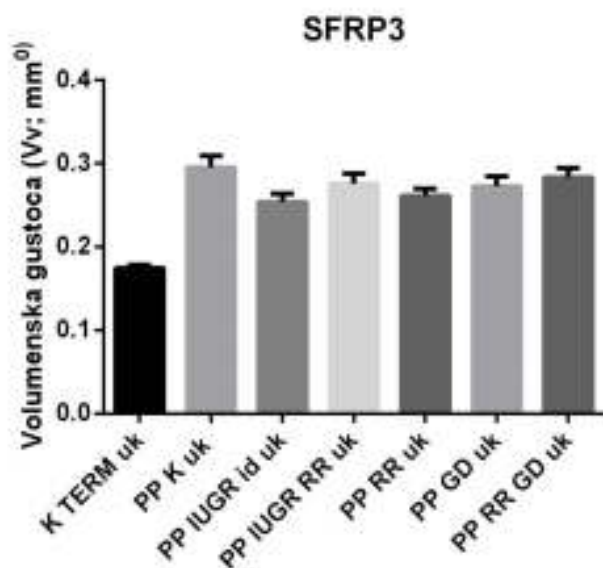


Slika 72. Prikaz ekspresije proteina SFRP3 u korionskim resicama prijevremeno porođenih patoloških posteljica te terminskih i prijevremenih kontrola (K TERM res = kontrola terminska resice, PP K res = prijevremena kontrola resice, PP IUGR id res = prijevremeni idiopatski IUGR resice, PP IUGR RR res = prijevremeni IUGR s povišenim tlakom resice, PP RR res = prijevremeni povišeni tlak resice, PP GD res = prijevremeni gestacijski dijabetes resice)

Tablica 69. Usporedba ukupne ekspresije proteina SFRP3 u prijevremeno porođenim patološkim posteljicama s terminskim i prijevremenim kontrolama

Ukupna ekspresija	Kontrole (terminske) p vrijednost	Kontrole (prijevremene) p vrijednost
Prijevremeni idiopatski IUGR	< 0,0001	0,6466
Prijevremni IUGR s tlakom	< 0,0001	ns
Prijevremeni tlak	< 0,0001	ns
Prijevremeni dijabetes	<0,0001	ns
Prijevremeni tlak i dijabetes	< 0,0001	ns

Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = $p > 0,9999$, nesignifikantno) Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 73. Prikaz ukupne ekspresije proteina SFRP3 u prijevremeno porođenim patološkim posteljicama te terminskim i prijevremenim kontrolama (K TERM uk = kontrola terminska ukupna ekspresija, PP K uk = prijevremena kontrola ukupna ekspresija, PP IUGR id uk = prijevremeni idiopatski IUGR ukupna ekspresija, PP IUGR RR uk = prijevremeni IUGR s povišenim tlakom ukupna ekspresija, PP RR uk = prijevremeni povišeni tlak ukupna ekspresija, PP GD uk = prijevremeni gestacijski dijabetes ukupna ekspresija, PP RR GD uk = prijevremeni tlak s gestacijskim dijabetesom ukupna ekspresija)

Statistički značajno izraženiju ukupnu ekspresiju SFRP3 antigena kao i statistički značajniju ekspresiju zasebno u decidui i korionskim resicama izmjerili smo u svim ispitivanim skupinama patoloških prijevremeno porođenih posteljica u odnosu na kontrolnu skupinu terminskih posteljica (Slike 71, 72 i 73).

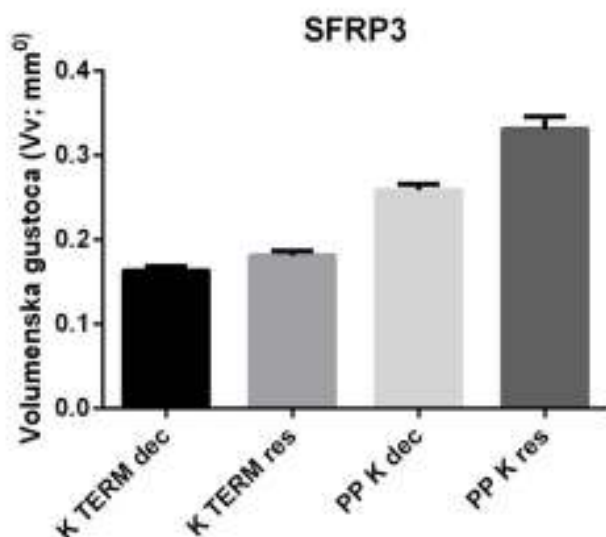
Uspoređujući skupine prijevremeno porođenih patoloških posteljica s kontrolnom skupinom prijevremeno porođenih posteljica, nismo našli statistički značajno različitu ekspresiju SFRP3 antigena u decidui niti u jednoj patološkoj skupini u odnosu na kontrolne prijevremeno porođene posteljice. U korionskim resicama, statistički značajno manja ekspresija SFRP3 nađena je u posteljicama iz trudnoća s idiopatskim IUGR, povišenim krvnim tlakom te povišenim tlakom i dijabetesom, dok skupina sa zastojem u rastu i tlakom nije bila statistički različita od prijevremene kontrole. Kod ukupne ekspresije SFRP3 u posteljici nije bilo statistički značajne razlike između patoloških skupina i prijevremenih kontrola. Navedene rezultate smo izračunali pomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom i prikazali na Slikama 71, 72 i 73.

Uspoređujući međusobno ekspresiju antigena SFRP3 u decidui i resicama, uočili smo da je SFRP3 statistički značajno izraženiji u resicama terminskih i prijevremenih kontrola nego u decidui (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Rezultate smo prikazali tabularno (Tablica 70) i grafički (Slika 74). Statistički značajno veća ekspresija u korionskim resicama u odnosu na deciduu nađena je i kod terminskog IUGR ($p < 0,0001$), terminskog povišenog tlaka majke uz gestacijski dijabetes ($p = 0,0230$) te prijevremenog IUGR uz povišeni tlak majke ($p = 0,0197$). U ostalim skupinama patoloških posteljica nije bilo statistički značajne razlike između ekspresije SFRP3 u resicama u odnosu na deciduu. Razlike između odgovarajućih grupa analizirane su Mann Whitney testom.

Tablica 70. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui s ekspresijom u korionskim resicama kontrolnih terminskih i prijevremeno porođenih posteljica

	decidua	resice	p vrijednost
Kontrole terminske	0,1636 $\pm$ 0,005131	0,1813 $\pm$ 0,005163	0,0213
Kontrole prijevremene	0,2589 $\pm$ 0,007025	0,3312 $\pm$ 0,01490	0,0063

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 74. Usporedba ekspresije proteina SFRP3 u decidui s ekspresijom u korionskim resicama kontrolnih terminskih i prijevremeno porođenih posteljica (K TERM dec = terminske kontrole decidua; K TERM res= terminske kontrole resice; PP K dec prijevremene kontrole decidua; PP K res= prijevremene kontrole resice)

5.3. Ekspresija proteina TCF1

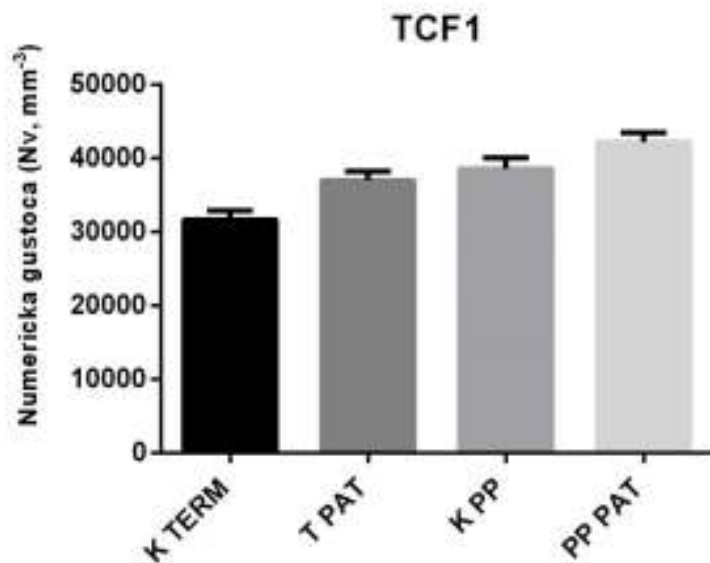
Ekspresiju TCF1 antigena detektirali smo u decidui humanih posteljica. Budući da se radi o nuklearnom proteinu, kvantifikaciju smo proveli mjerenjem stereološke varijable numeričke gustoće – N_v . Kako bi rezultate kvantifikacije ovog antigena mogli usporediti s rezultatima kvantifikacije ostalih proteina, mjerili smo i volumensku gustoću – V_v , te smo izmjerili $0,04936 \pm 0,002076 \text{ mm}^0$ u terminskim kontrolama.

Uspoređujući kontrolne terminske i prijevremene posteljice s patološkim terminskim i prijevremeno porođenim posteljicama pomoću Kruskal Wallis ANOVA nismo dobili statistički značajnu razliku među skupinama. Rezultate smo prikazali u Tablici 71 te na Slici 75.

Tablica 71. Prikaz numeričke gustoće TCF1 antigena (N_v ; mm^{-3}) u kontrolnim terminskim i prijevremeno porođenim posteljicama i posteljicama iz terminskih i prijevremeno porođenih patoloških trudnoća

Kontrola (terminska) (N_v ; mm^{-3})	Terminske posteljice iz patoloških trudnoća (N_v ; mm^{-3})	p vrijednost
31648±1222	36979±1256	ns
Kontrola (prijevremeni porod) (N_v ; mm^{-3})	Prijevremene posteljice iz patoloških trudnoća (N_v ; mm^{-3})	
38544±1459	42173±1295	ns

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = nesignifikantno, $p > 0,9999$)



Slika 75. Prikaz numeričke gustoće TCF1 antigena ($Nv; mm^{-3}$) u decidui kontrolnih terminskih posteljica i posteljica iz terminskih patoloških trudnoća, te u kontrolnim prijevremeno porođenim posteljicama i prijevremeno porođenim posteljicama iz patoloških trudnoća (K TERM = terminske kontrole; T PAT = terminska patologija; K PP= prijevremene kontrole; PP PAT = prijevremena patologija)

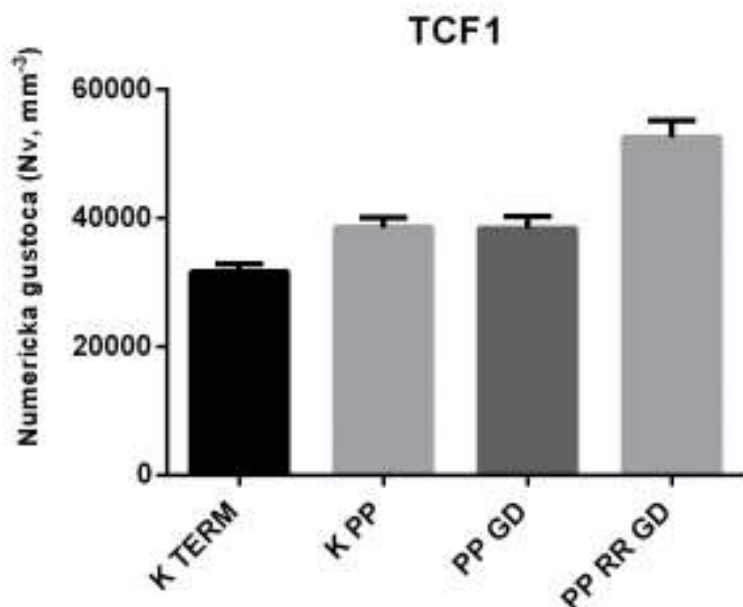
Usporedivši kontrolne terminske s kontrolnim prijevremeno porođenim posteljicama, našli smo statistički značajniju izraženost TCF1 antigena u kontrolnim prijevremenim posteljicama. Analizirajući zasebno skupine patoloških posteljica, pomoću Kruskal Wallis ANOVA dobili smo statistički značajnu razliku u skupinama prijevremeno porođenih posteljica iz trudnoća kompliciranih gestacijskim dijabetesom, s i bez povišenog tlaka majke. Rezultate smo prikazali u Tablici 72.

Tablica 72. Usporedba ekspresije proteina TCF1u decidui prijevremeno porođenih posteljica s gestacijskim dijabetesom s terminskim i prijevremenim kontrolama – numerička ($Nv; mm^{-3}$) gustoća

	Numerička gustoća ($Nv; mm^{-3}$)	Kontrole terminske p vrijednost	Kontrole prijevremene p vrijednost
Terminske kontrole	31648±1222		0,0311
Prijevremene kontrole	38544±1459	0,0311	
Prijevremeni dijabetes	38368±1923	0,0059	ns
Prijevremeni tlak i dijabetes	52547±2577	<0,0001	0,3434

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$)

analizirane su Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom . Podebljane vrijednosti su statistički značajne. (ns = nesignifikantno, $p > 0,9999$)



Slika 76. Prikaz numeričke gustoće TCF1 antigena (Nv, mm^{-3}) u posteljicama s gestacijskim dijabetesom i terminskim i prijevremenim kontrolama. (KTERM= terminske kontrole, K PP = prijevremene kontrole decidua, PP GD = prijevremeno porođeni s gestacijskim dijabetesom, PP RR GD = prijevremeno porođeni s tlakom i gestacijskim dijabetesom)

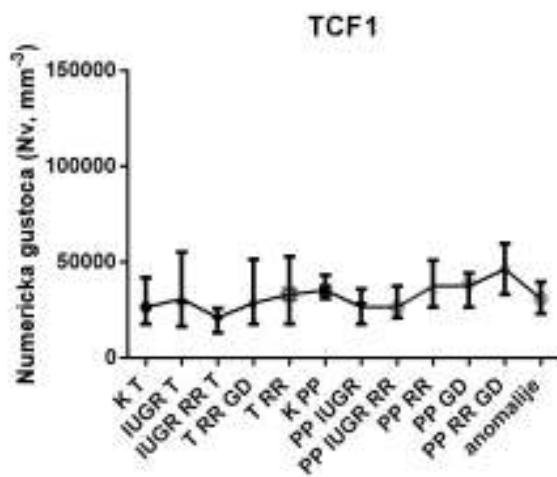
Obzirom na raspon dobivenih vrijednosti numeričke gustoće, usporedili smo medijane pojedinih skupina ispitivanih posteljica. Uspoređujući kontrolne terminske i prijevremene posteljice s patološkim terminskim i prijevremeno porođenim ispitivanim skupinama, pomoću Kruskal Wallis ANOVA dobili smo statistički značajnu razliku samo u skupinama prijevremeno porođenih posteljica iz trudnoća kompliciranih gestacijskim dijabetesom, s i bez povišenog tlaka majke. Ostale ispitivane skupine nisu pokazale statistički značajnu razliku niti u usporedbi s terminskim, niti prijevremeno porođenim kontrolama.

Rezultate analize prikazali smo u Tablici 73,74 i 75, te na Slikama 77, 78 i 79.

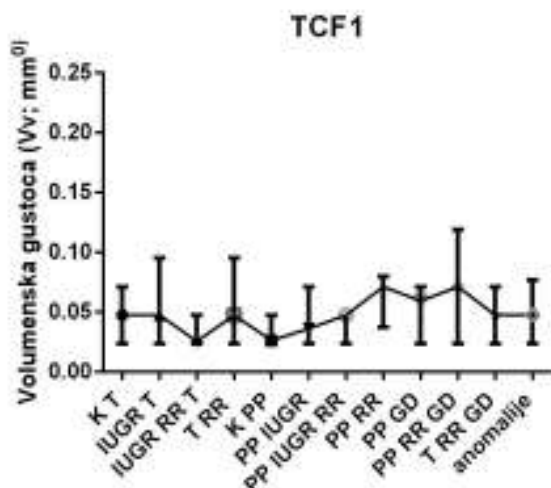
Tablica 73. Usporedba medijana ekspresije proteina TCF1u decidui prijevremeno porođenih patoloških posteljica s terminskim i prijevremenim kontrolama – numerička (Nv; mm⁻³) i volumenska gustoća (Vv; mm⁰)

		Medijan	Kontrole terminske p vrijednost	Kontrole prijevremene p vrijednost
Terminske kontrole	Nv	26550		ns
	Vv	0,04762		ns
Prijevremene kontrole	Nv	35400	ns	
	Vv	0,04762	ns	
Prijevremeni dijabetes	Nv	37612	0,0001	ns
	Vv	0,05952	0,3779	ns
Prijevremeni tlak i dijabetes	Nv	45356	< 0,0001	0,2587
	Vv	0,07143	0,0015	0,7286

Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane supomoću Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom. (ns = $p > 0,9999$, nesignifikantno) Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 77. Prikaz medijana ekspresije TCF1 antigena s interkvartilnim rasponom izmjenjenog numeričkom gustoćom u decidui patoloških terminskih i prijevremenih posteljica te u kontrolnim skupinama posteljica (K T = kontrola terminska, IUGR T = terminski idiopatski IUGR, IUGR RR T = terminski IUGR s povišenim tlakom, T RR GD = terminski tlak s gestacijskim dijabetesom, T RR = terminski povišeni tlak, K PP = prijevremena kontrola, PP IUGR = prijevremeni IUGR, PP IUGR RR = prijevremeni IUGR s tlakom, PP RR = prijevremeni tlak, PP GD = prijevremeni gestacijski dijabetes, PP RR GD = prijevremeni tlak s gestacijskim dijabetesom)



Slika 78. Prikaz medijana ekspresije TCF1 antigena s interkvartilnim rasponom izmjenjenog volumenskom gustoćom u decidui patoloških terminskih i prijevremeno porođenih posteljica te u kontrolnim skupinama posteljica (K T = kontrola terminska, IUGR T = terminski idiopatski IUGR, IUGR RR T = terminski IUGR s povišenim tlakom, T RR = terminski povišeni tlak, K PP = prijevremena kontrola, PP IUGR = prijevremeni IUGR, PP IUGR RR = prijevremeni IUGR s tlakom, PP RR = prijevremeni tlak, PP GD = prijevremeni gestacijski dijabetes, PP RR GD = prijevremeni tlak s gestacijskim dijabetesom, T RR GD = terminski tlak s gestacijskim dijabetesom)

Objema varijablama izračunali smo statistički značajno veći medijan ekspresije TCF1 antigena u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom i dijabetesom u odnosu na kontrolne terminske posteljice.

Također je statistički značajno veća ekspresija TCF1 antigena izmjerena numeričkom gustoćom u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s dijabetesom u odnosu na kontrolne terminske posteljice. Ostale skupine patoloških posteljica nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu. Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane su Kruskal Wallis ANOVA a *post hoc* testiranje je načinjeno Dunnovim *post hoc* testom.

Međusobnom usporedbom patoloških skupina posteljica našli smo najveći medijan ekspresije TCF1 antigena izmjeren numeričkom gustoćom u prijevremenim posteljicama iz trudnoća kompliciranih gestacijskim dijabetesom uz povišeni tlak majke, a najmanji u terminskim posteljicama iz trudnoća sa zastojem u rastu ploda s povišenim tlakom majke. Rezultati su prikazani u Tablici 74. Jednako tako raspoređene su i vrijednosti medijana izmjerene volumenskom gustoćom, a rezultati su prikazani u Tablici 75.

Tablica 74. Medijani ekspresije proteina TCF1 u decidui patoloških posteljica te kontrolnih terminskih i prijevremeno porođenih posteljica (numerička gustoća; N_v , mm^{-3})

(K T = kontrola terminska, K PP = prijevremena kontrola, IUGR T = terminski idiopatski IUGR, PP IUGR = prijevremeni IUGR, IUGR RR T = terminski IUGR s povišenim tlakom majke, PP IUGR RR = prijevremeni IUGR s povišenim tlakom, T RR = terminski povišeni tlak, PP RR = prijevremeni povišeni tlak, PP GD = prijevremeni gestacijski dijabetes, PP RR GD = prijevremeni tlak s gestacijskim dijabetesom, T RR GD = terminski tlak s gestacijskim dijabetesom)

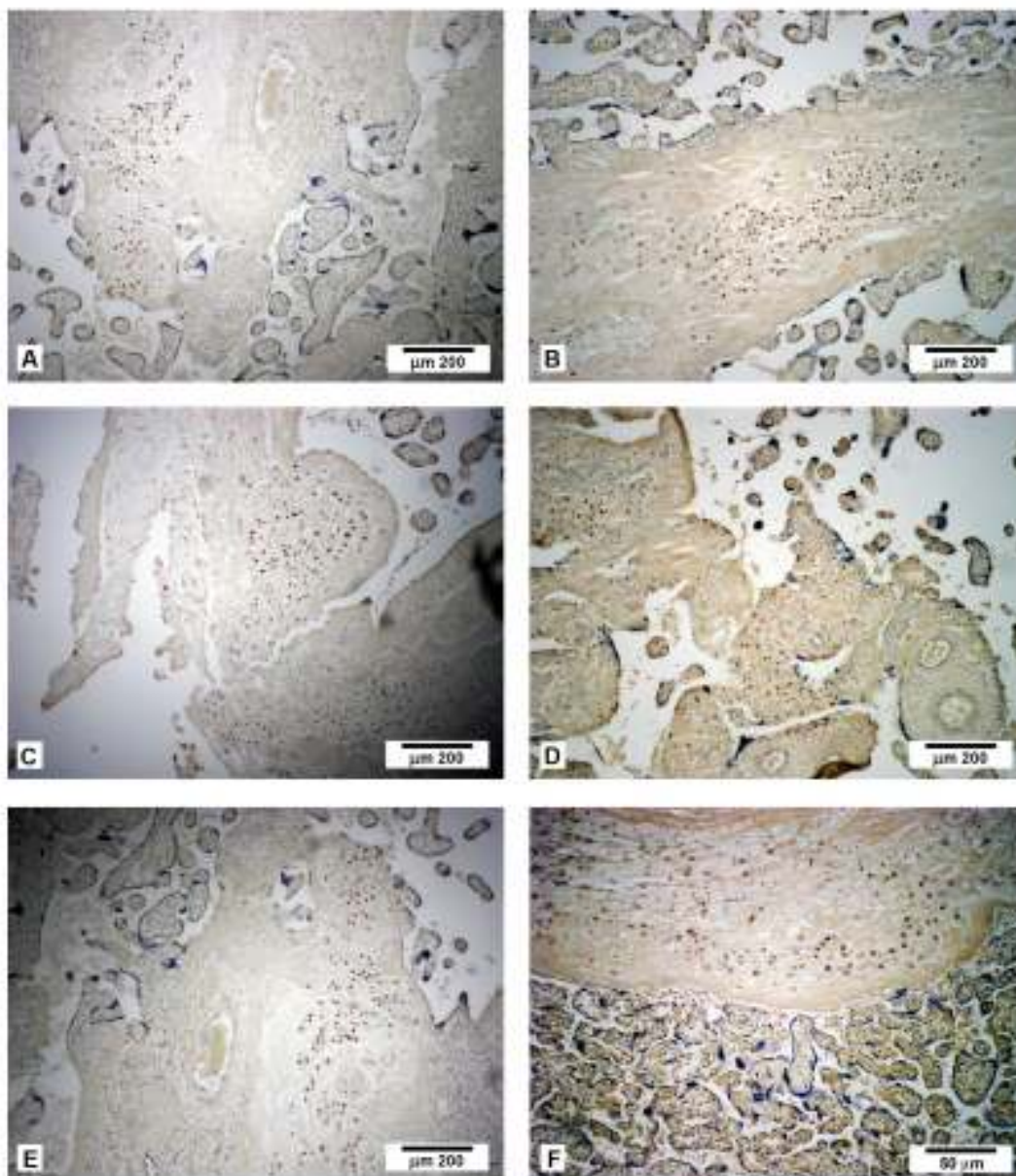
N_v , mm^{-3}	K T	K PP	IUGR T	PP IUGR	IUGR RR T	PP IUGR RR
Medijan	26550	35400	30975	26550	21019	26550
	T RR	PP RR	PP GD	PP RR GD	T RR GD	anomalije
Medijan	33187	37002	37612	45356	28762	30975

Tablica 75. Medijani ekspresije proteina TCF1 u decidui patoloških posteljica te kontrolnih terminskih i prijevremeno porođenih posteljica (volumenska gustoća; V_v , mm^0)

(K T = kontrola terminska, K PP = prijevremena kontrola, IUGR T = terminski idiopatski IUGR, PP IUGR = prijevremeni IUGR, IUGR RR T = terminski IUGR s povišenim tlakom majke, PP IUGR RR = prijevremeni IUGR s povišenim tlakom, T RR = terminski povišeni tlak, PP RR = prijevremeni povišeni tlak, PP GD = prijevremeni gestacijski dijabetes, PP RR GD = prijevremeni tlak s gestacijskim dijabetesom, T RR GD = terminski tlak s gestacijskim dijabetesom)

V_v , mm^0	K T	K PP	IUGR T	PP IUGR	IUGR RR T	PP IUGR RR
Medijan	0,04762	0,02632	0,04762	0,03631	0,02566	0,04762
	T RR	PP RR	PP GD	PP RR GD	T RR GD	anomalije
Medijan	0,04762	0,06143	0,05952	0,07143	0,04762	0,04762

Ekspresija nuklearnog antigena TCF1 najjače je izražena u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća kompliciranih gestacijskim dijabetesom i povišenim tlakom majke. Imunohistokemijsko bojanje takvih posteljica prikazano je na Slici 79.



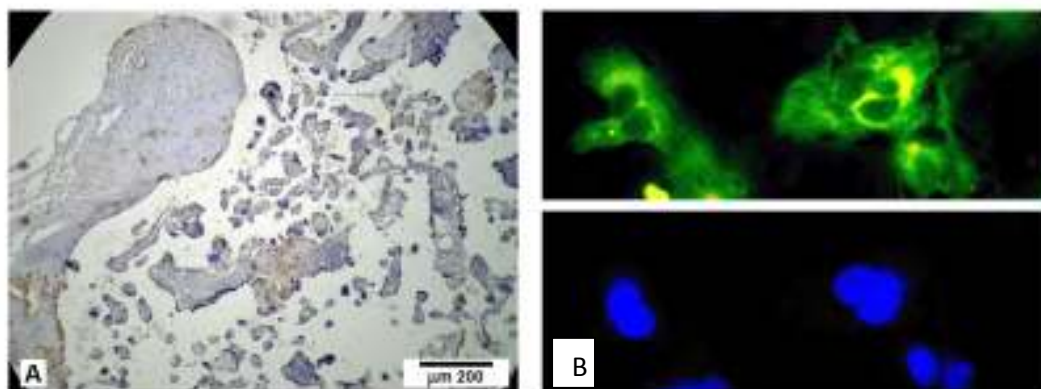
Slika 79. Ekspresija nuklearnog antigena TCF1 u posteljicama s gestacijskim dijabetesom i povišenim tlakom majke (B, D, F) i u kontrolnim posteljicama (A,C, E) (DAB, kontrastirano hemalaunom)

5.4. Ekspresija proteina ELF5

Ukupnu ekspresiju proteina ELF5 istraživali smo u kontrolnim terminskim odnosno prijevremeno porođenim posteljicama i slijedećim patološkim stanjima:

1. Terminski idiopatski IUGR
2. IUGR uz povišen krvni tlak u prijevremenim porodima
3. Povišeni krvni tlak uz eutrofičnu djecu u prijevremenim porodima
4. Povišeni krvni tlak uz gestacijski dijabetes u prijevremenim porodima

Imunohistokemijskim i imunofluorescentnim bojanjem ekspresija ELF5 nađena je u citoplazmi decidualnih stanica i stanicama trofoblasta korionskih resica posteljice (Slika 80).



Slika 80. Ekspresija proteina ELF5 u kontrolnim terminskim posteljicama dobivena imunohistokemijski (A) i imunofluorescencijski (B).

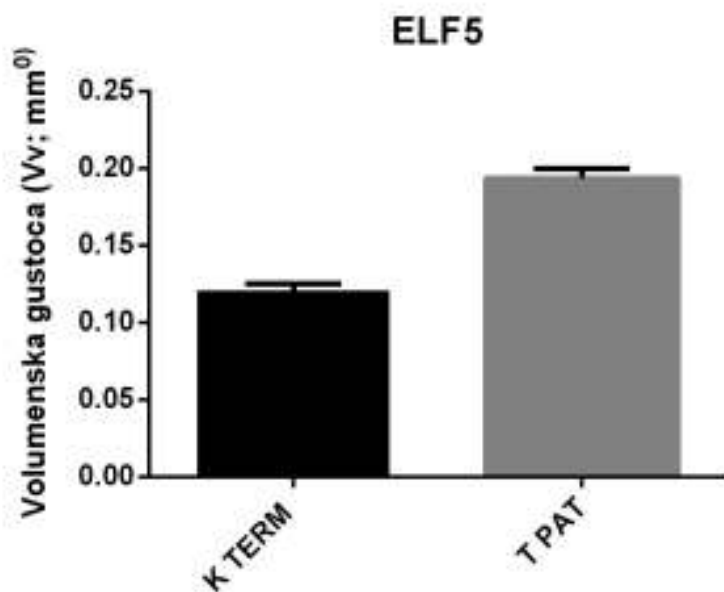
5.4.1. Ekspresija proteina ELF5 u patološkim terminskim i patološkim prijevremeno porođenim posteljicama

Ukupna ekspresija proteina ELF5 bila je statistički značajno veća u patološkim terminskim posteljicama u usporedbi s kontrolnim terminskim posteljicama (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Jednako tako, ukupna ekspresija proteina ELF5 bila je statistički značajno veća u patološkim prijevremeno porođenim posteljicama u usporedbi s kontrolnim prijevremenim posteljicama (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 76) i u obliku grafa (Slika 81 i 82).

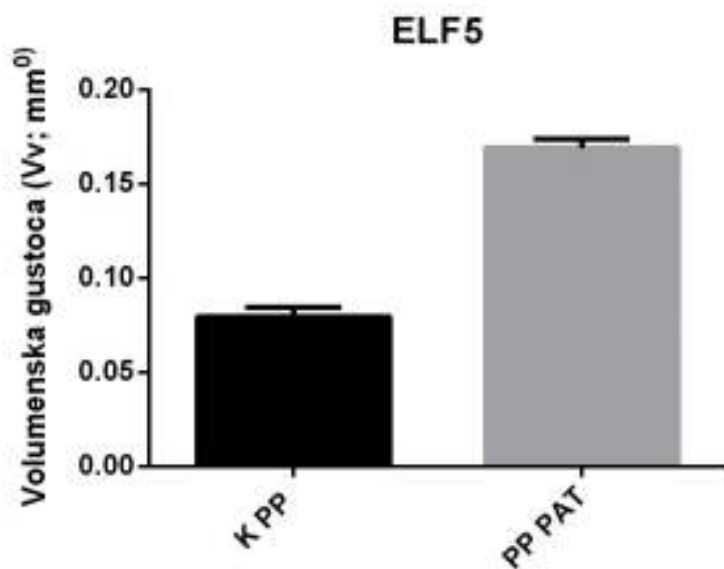
Tablica 76. Prikaz volumenske gustoće ELF5 antigena (V_v, mm^0) u kontrolnim terminskim i prijevremeno porođenim posteljicama i posteljicama iz terminskih i prijevremeno porođenih patoloških trudnoća

Kontrola (terminska) (V_v, mm^0)	Terminske posteljice iz patoloških trudnoća (V_v, mm^0)	p vrijednost
0,1208±0,004462	0,1937±0,006034	<0,0001
Kontrola (prijevremeni porod) (V_v, mm^0)	Prijevremene posteljice iz patoloških trudnoća (V_v, mm^0)	
0,07937±0,003952	0,1691±0,004634	<0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 81. Prikaz volumenske gustoće ELF5 antigena (Vv, mm⁰) u kontrolnim terminskim posteljicama i posteljicama iz terminskih patoloških trudnoća (K TERM = terminske kontrole; T PAT = terminska patologija)



Slika 82. Prikaz volumenske gustoće ELF5 antigena (Vv, mm⁰) u kontrolnim prijevremeno porođenim posteljicama i prijevremeno porođenim posteljicama iz patoloških trudnoća (K PP= prijevremene kontrole; PP PAT = prijevremena patologija)

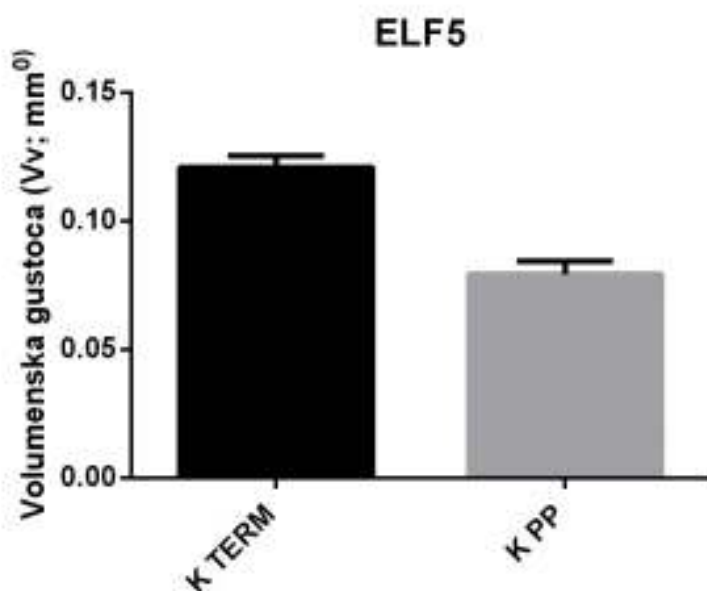
5.4.2. Ekspresija proteina ELF5 u posteljicama kod prijevremenog poroda bez pridružene patologije (kontrolne prijevremeno porođene posteljice)

Ekspresija proteina ELF5 bila je statistički značajno manja u posteljicama kod prijevremenog poroda bez druge pridružene patologije u usporedbi s kontrolnim terminskim posteljicama (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 77) i u obliku grafa (Slika 83).

Tablica 77. Usporedba ukupne ekspresije proteina ELF5 u prijevremeno porođenim posteljicama bez druge patologije s terminskim kontrolama

Volumenska gustoća Vv; mm ⁰	Normalne (kontrolne) terminske posteljice	Normalne (kontrolne) prijevremeno porođene posteljice	p vrijednost
Ukupna ekspresija	0,1208±0,004462	0,07937±0,003952	0,0068

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 83. Prikaz volumenske gustoće ELF5 antigena (Vv, mm⁰) u prijevremeno porođenim posteljicama i terminskim kontrolama. (K TERM = terminske kontrole, K PP prijevremeno porođene posteljice, kontrolna skupina)

5.4.3. Ekspresija proteina ELF5 u posteljicama kod terminskog idiopatskog IUGR-a

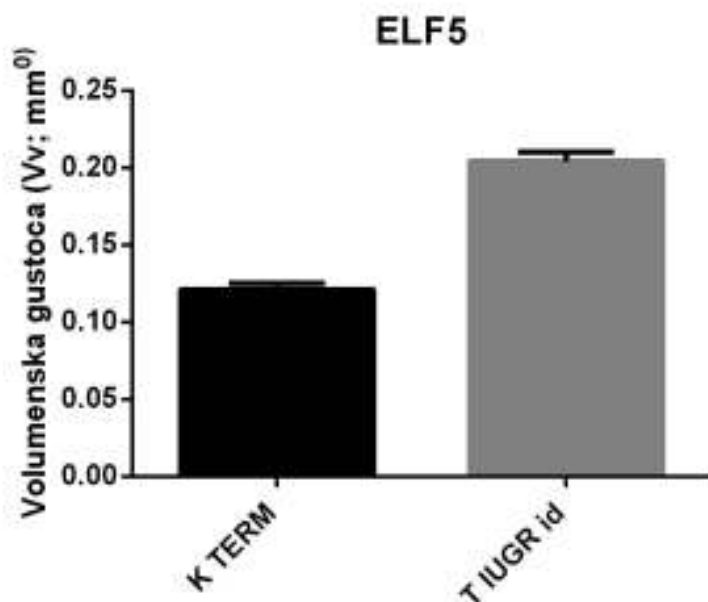
Ukupna ekspresija proteina ELF5 bila je statistički značajno veća u posteljicama kod terminskog idiopatskog IUGR-a u usporedbi s kontrolnim terminskim posteljicama (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 78) i u obliku grafa (Slika 84).

Ekspresiju ELF5 antigena našli smo u citoplazmi decidua stanica te u korionskim resicama posteljica kod terminskog idiopatskog IUGR-a (Slika 85).

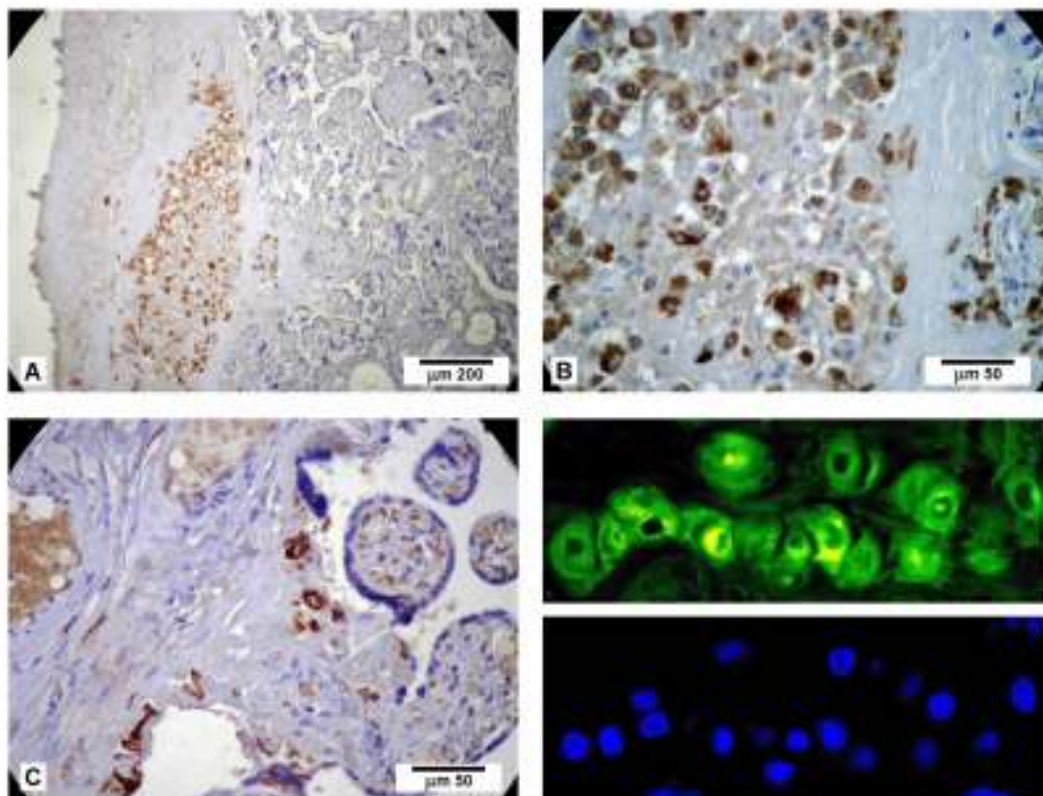
Tablica 78. Usporedba ukupne ekspresije proteina ELF5 u terminskim posteljicama iz trudnoća s idiopatskim IUGR s terminskim kontrolama

Volumenska gustoća Vv; mm ⁰	Kontrola (termiska)	Terminski idiopatski IUGR	p vrijednost
Ukupna ekspresija	0,1208±0,004462	0,2043±0,00578	<0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 84. Prikaz volumenske gustoće ELF5 antigena (Vv, mm⁰) u posteljicama kod terminskog idiopatskog IUGR-a i terminskim kontrolama. (K TERM= terminske kontrole, T IUGR id = terminski idiopatski IUGR)



Slika 85. Ekspresija ELF5 antigena u decidui (A, B) i korionskim resicama (C) u posteljicama kod terminskog idiopatskog IUGR-a. Imunoflourescencijska metoda prikazuje ekspresiju u citoplazmi decidua stanica.

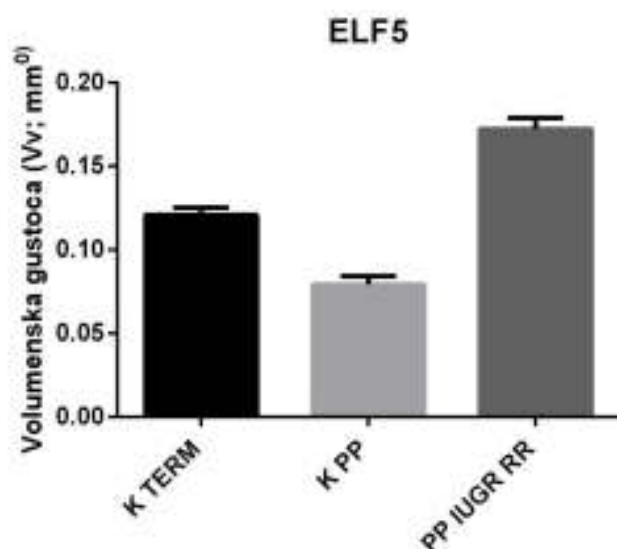
5.4.4. Ekspresija proteina ELF5 u prijevremeno porođenim posteljicama uz IUGR i povišeni krvni tlak majke

Ekspresija proteina ELF5 bila je statistički značajno veća u posteljicama kod prijevremenog idiopatskog IUGR-a uz povišen krvni tlak u usporedbi s kontrolnim terminskim posteljicama. Jednako tako, razlika je bila statistički značajna i u usporedbi s kontrolnim prijevremenim posteljicama (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 79) i u obliku grafa (Slika 86). Ekspresiju ELF5 antigena našli smo u citoplazmi decidua stanica te u korionskim resicama prijevremeno porođenih posteljica iz trudnoća s povišenim tlakom i zastojem u rastu ploda (Slika 87).

Tablica 79. Usporedba ukupne ekspresije proteina ELF5 u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća sa zastojem u rastu i povišenim tlakom majke s terminskim i prijevremenim kontrolama

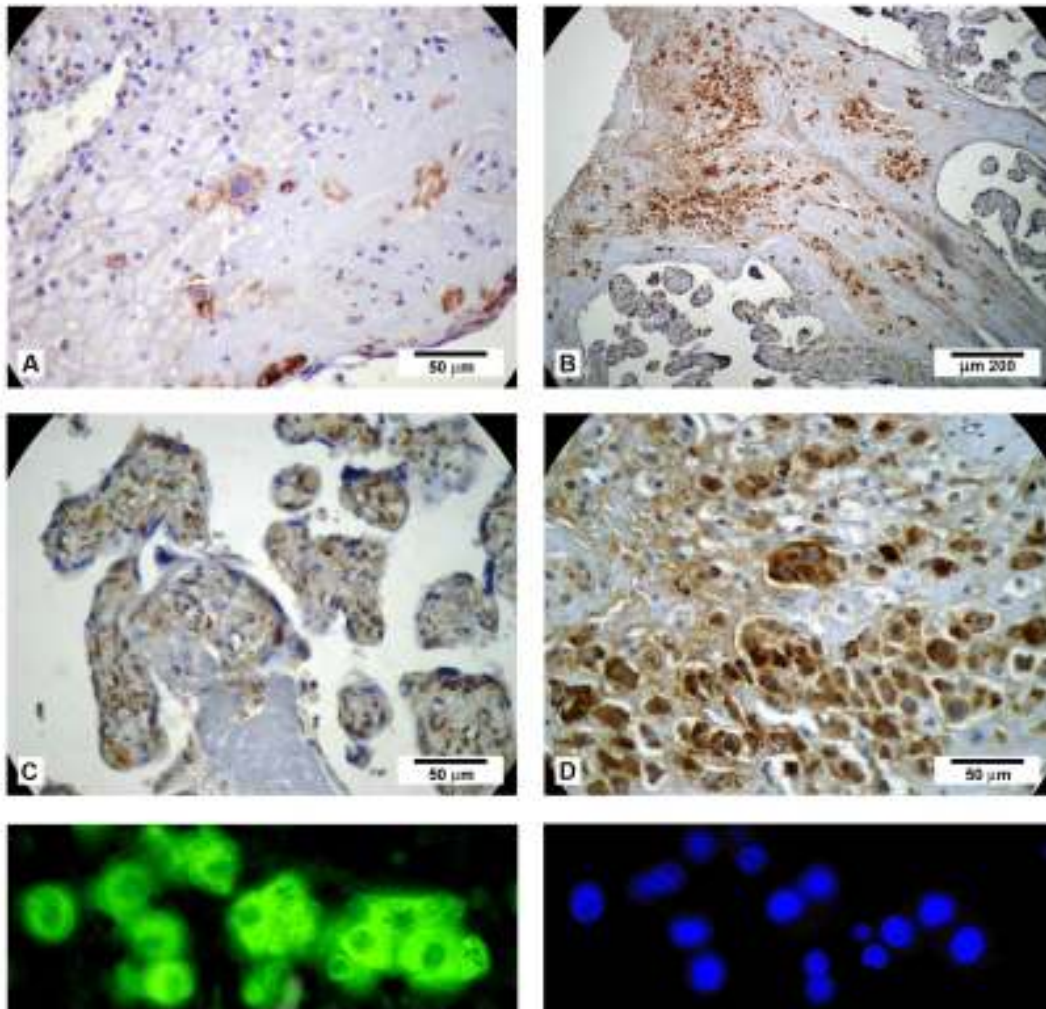
Prijevremeni porod uz IUGR i povišen tlak ($V_v; mm^0$)	Kontrola terminska ($V_v; mm^0$)	p vrijednost	Kontrola prijevremena ($V_v; mm^0$)	p vrijednost
$0,1724 \pm 0,006774$	$0,1208 \pm 0,004462$	<0,0001	$0,07937 \pm 0,003952$	<0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 86. Prikaz volumenske gustoće ELF5 antigena (V_v, mm^0) u posteljicama kod prijevremeno porođenog IUGR-a uz povišen krvni tlak majke te terminskim i prijevremenim

kontrolama. (K TERM = terminske kontrole, K PP = prijevremene kontrole, PP IUGR RR = prijevremeno porođene posteljice iz trudnoća s IUGR i povišenim tlakom majke)



Slika 87. Ekspresija ELF5 antigena u decidui (A, B, D) i korionskim resicama (C) u posteljicama kod prijevremeno porođenog IUGR-a uz povišen krvni tlak. Imunoflouescencijska metoda prikazuje ekspresiju u citoplazmi decidua stanica.

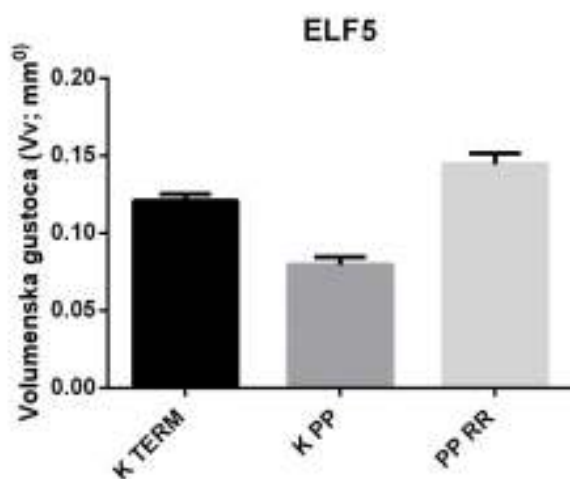
5.4.5. Ekspresija proteina ELF5 u prijevremeno porođenim posteljicama kod povišenog krvnog tlaka majke i eutrofične djece

Ekspresija proteina ELF5 bila je statistički značajno veća u posteljicama kod povišenog krvnog tlaka uz djecu eutrofičnu za dob, spol i paritet majke u usporedbi s terminskim kontrolnim posteljicama. (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Jednako tako, statistički značajna razlika nađena je i u odnosu na prijevremeno porođene posteljice (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 80) i u obliku grafa (Slika 88). Ekspresiju ELF5 antigena našli smo u citoplazmi decidua stanica te u korionskim resicama prijevremeno porođenih posteljica s povišenim tlakom i eutrofičnom djecom (Slika 89).

Tablica 80. Usporedba ukupne ekspresije proteina ELF5 u prijevremeno porođenim posteljicama s povišenim tlakom majke uz eutrofičnu djecu s terminskim i prijevremenim kontrolama

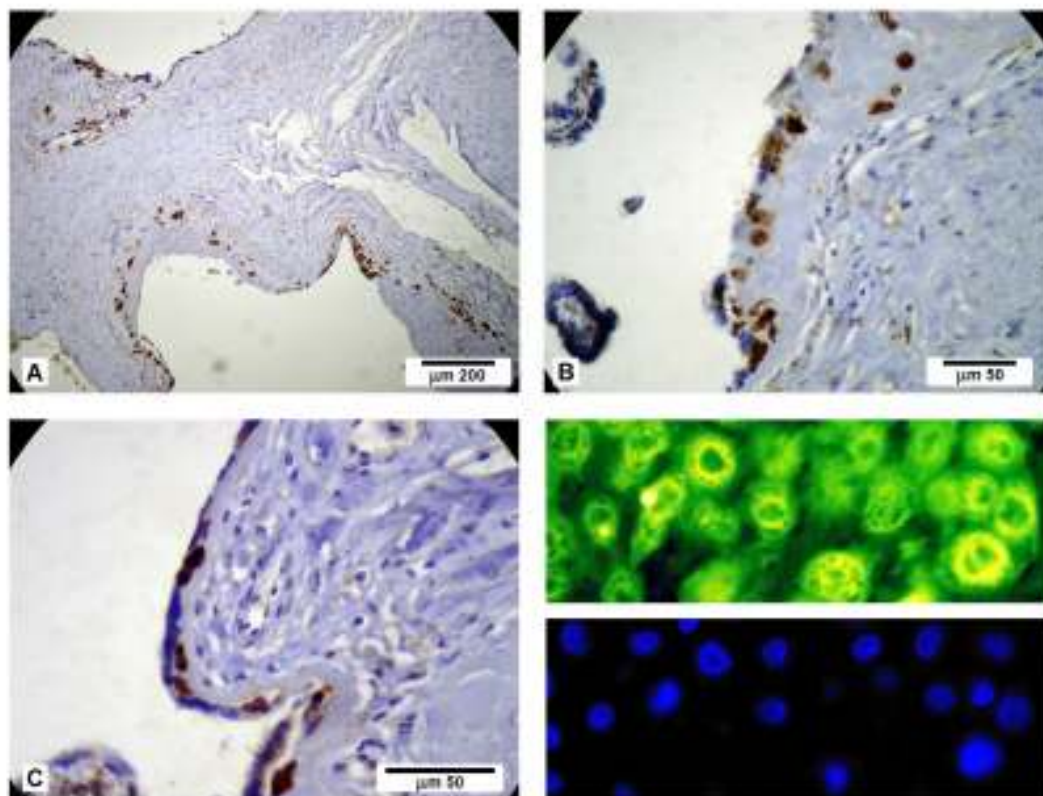
Prijevremeni porod uz povišen tlak (Vv; mm ⁰)	Kontrola terminska (Vv; mm ⁰)	p vrijednost	Kontrola prijevremena (Vv; mm ⁰)	p vrijednost
0,1443±0,007033	0,1208±0,004462	0,0057	0,07937±0,003952	<0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 88. Prikaz volumenske gustoće ELF5 antigena (Vv, mm⁰) u prijevremeno porođenim posteljicama kod povišenog krvnog tlaka uz eutrofičnu djecu te prijevremenim i terminskim kontrolama. (K TERM = terminske kontrole, K PP = prijevremene kontrole, PP RR=

prijevremeno porođene posteljice iz trudnoća s povišenim tlakom majke i eutrofičnom djecom)



Slika 89. Ekspresija ELF5 antigena u posteljicama kod povišenog krvnog tlaka uz eutrofičnu djecu. Imunoflourescencijska metoda prikazuje ekspresiju u citoplazmi decidua stanica.

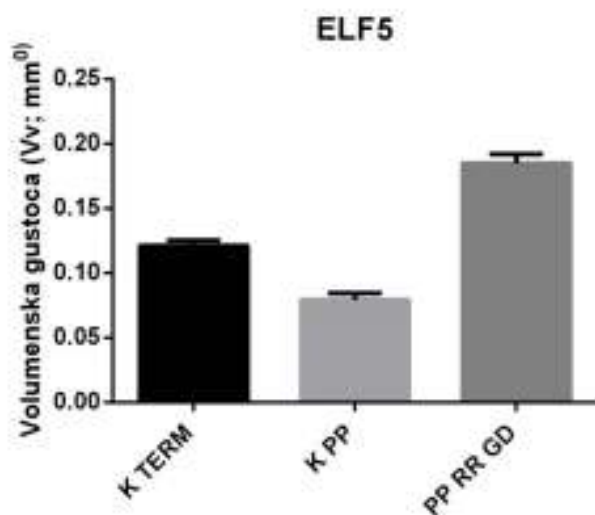
5.4.6. Ekspresija proteina ELF5 u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom i gestacijskim dijabetesom

Ekspresija proteina ELF5 bila je statistički značajno veća u prijevremno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom kompliciranim gestacijskim dijabetesom u usporedbi s kontrolnim terminskim i prijevremeno porođenim posteljicama (Mann Whitney test; $p < 0,05$). Dobivene rezultate prikazali smo tabularno (Tablica 81) i u obliku grafa (Slika 90). Ekspresiju ELF5 antigena našli smo u citoplazmi decidua stanica te u korionskim resicama prijevremeno porođenih posteljica u trudnoćama kompliciranim povišenim krvnim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom (Slika 91).

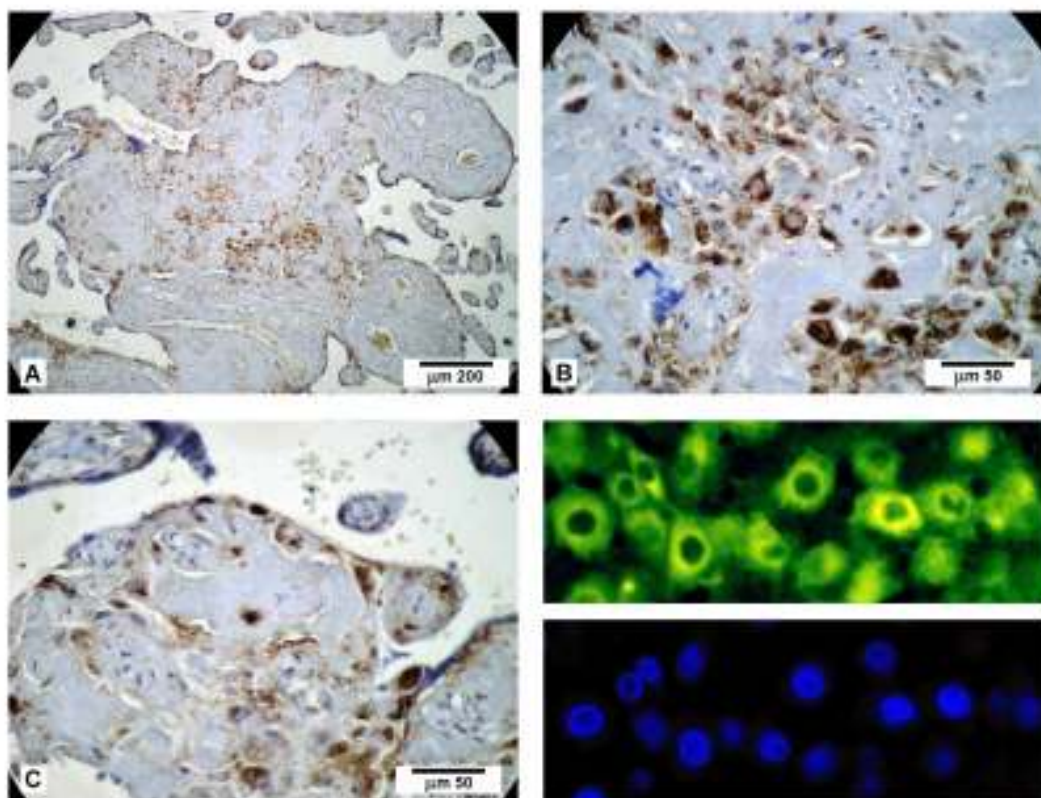
Tablica 81. Usporedba ukupne ekspresije proteina ELF5 u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća kompliciranih gestacijskim dijabetesom i povišenim tlakom majke s terminskim i prijevremenim kontrolama

Prijevremeni porod uz povišen tlak i gestacijski dijabetes (Vv; mm ⁰)	Kontrola terminska (Vv; mm ⁰)	p vrijednost	Kontrola prijevremena (Vv; mm ⁰)	p vrijednost
0,1849±0,007112	0,1208±0,004462	< 0,0001	0,07937±0,003952	<0,0001

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 90. Prikaz volumenske gustoće ELF5 antigena (Vv, mm⁰) u posteljicama iz trudnoća kompliciranih povišenim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom te terminskim i prijevremenim kontrolama. (K TERM = terminske kontrole, K PP = prijevremene kontrole, PP RR GD = prijevremeno porođene posteljice iz trudnoća s povišenim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom)



Slika 91. Ekspresija ELF5 antigena u decidui (B) i korionskim resicama (A, C) u posteljicama iz trudnoća kompliciranih povišenim tlakom i gestacijskim dijabetesom. Imunoflourescencijska metoda prikazuje ekspresiju u citoplazmi decidua stanica.

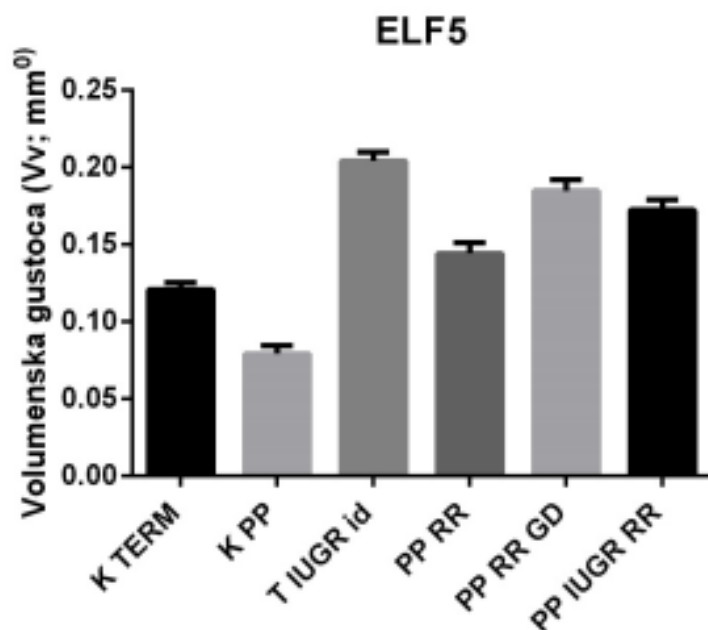
5.4.7. Međusobna usporedba ekspresije proteina ELF5 u posteljicama iz patoloških trudnoća te usporedba s terminskim i prijevremenim kontrolama

Ekspresija antigena ELF5 statistički je značajno veća u posteljicama svih ispitivanih skupina patoloških trudnoća u odnosu na kontrolne terminske i prijevremeno porođene posteljice. Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa analizirane su Mann Whitney testom, $p < 0,05$. Kruskal Wallis ANOVA s post hoc Dunnovim testom pokazala je da nema statistički značajne razlike između prijevremeno porođenih patoloških skupina. Najjača ekspresija ELF5 nađena je kod terminskog IUGR. Rezultati su prikazani tabularno (Tablica 82) i u obliku grafa (Slika 92).

Tablica 82. Usporedba ekspresije proteina ELF5 u posteljicama iz patoloških trudnoća s terminskim i prijevremenim kontrolama

	Kontrole (terminske) p vrijednost	Kontrole (prijevremene) p vrijednost
Terminski idiopatski IUGR	<0,0001	<0,0001
Prijevremeni tlak	0,0057	<0,0001
Prijevremeni tlak i dijabetes	<0,0001	<0,0001
Prijevremni IUGR s tlakom	<0,0001	<0,0001

Statistički značajne razlike između odgovarajućih grupa ($p < 0,05$) analizirane su Mann Whitney testom. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.



Slika 92. Prikaz volumenske gustoće ELF5 antigena (V_v , mm^0) u posteljicama iz patoloških trudnoća te u terminskim i prijevremenim kontrolama. (K TERM = terminske kontrole, K PP = prijevremene kontrole, T IUGR id= terminski idiopatski IUGR, PP RR = prijevremeno porođene posteljice iz trudnoća s povišenim tlakom majke, PP RR GD = prijevremeno porođene posteljice iz trudnoća s povišenim tlakom majke i gestacijskim dijabetesom, PP IUGR RR = prijevremeno porođene posteljice iz trudnoća s IUGR i povišenim tlakom majke)

6. RASPRAVA

Razvoj posteljice koordinirani je proces diferencijacije staničnih linija trofoblasta (61, 228). Vilozni se trofoblast diferencira i stapa u multinuklearni sinciciotrofoblast, dok se stanice ekstraviloznog trofoblasta infiltriraju u endometrij formirajući posteljicu i modelirajući majčine spiralne arterije (229,230).

Cilj ovog rada bio je analizirati ekspresiju proteina uključenih u diferencijaciju stanica trofoblasta u zdravoj posteljici te u posteljicama iz patoloških stanja u trudnoći koja rezultiraju zastojem u rastu ploda.

Jedan od ključnih događaja placentacije je epitelno - mezenhimna tranzicija koja omogućuje intersticijsku i endovaskularnu invaziju stanica trofoblasta (165). Pravovremeno odvijanje ove tranzicije orkestrirano je nizom signalnih puteva a jedan od njih je upravo signalni put Wnt. To je razlog zbog kojeg smo u ovom radu odabrali do sada slabije istraženu ekspresiju negativnih regulatora Wnt signalnih puteva SFRP1 i SFRP3, te pozitivnog regulatora TCF1. Istovremeno smo odabrali još jedan neovisni, ali posredno povezani biljeg epitelnih stanica protein ELF5.

Pretpostavili smo da će u tkivima sa slabije izraženom invazivnošću trofoblasta, dakle onima koja su rezultat neuspješne invazije decidue odnosno ležišta posteljice, prijenos signala Wnt signalnim putem biti smanjen. Prema dosadašnjim spoznajama neuspješna je invazija trofoblasta zapažena u posteljicama fetusa sa zastojem u rastu i u hipertenzivnim poremećajima (231, 232). Stoga smo istražili terminske posteljice dobivene iz trudnoća s takvim poremećajima i u njima procijenili aktivnost Wnt signalnog puta mjereći izraženost SFRP1 i SFRP3 te transkripcijskog faktora TCF1. Istražili smo prostornu i vremensku distribuciju SFRP1 i SFRP3 u normalnim posteljicama (kontrolna skupina) i u posteljicama iz patoloških trudnoća. Budući da inhibitori puta koji potiče EMT sprječavaju postizanje mezenhimnog fenotipa stanica i time umanjuju sposobnost migracije i invazije invazivnog trofoblasta, očekivali smo pojačanu izraženost tih inhibitora u stanjima i/ili bolestima koje bi mogle biti uzrokovane neuspješnom ili nedovoljnom EMT stanica ekstraviloznog trofoblasta.

ELF5 u početku trudnoće stvara pozitivnu povratnu spregu s genima matičnih stanica trofoblasta *Cdx2* i *Eomes* te usmjerava diferencijaciju u stanične linije trofoblasta. Najizraženiji je u prvom tromjesečju trudnoće, a u drugom i trećem tromjesečju ekspresija ELF5 pada 3-4 puta (30). Pokazalo se i da ELF5 inhibira EMT direktnim represivnim

djelovanjem na transkripcijski faktor SNAIL, koji je poznat kao pokretač EMT (179). Očekivali smo stoga da će u posteljicama iz patoloških trudnoća u kojima se pretpostavlja postojanje neuspješne EMT, izraženost ELF5 proteina biti povišena.

6.1. SFRP1 i SFRP3

6.1.1. Prijevremeni porodi

Budući da je invazija trofoblasta proces koji se mijenja napredovanjem trudnoće, najprije smo usporedili kontrolne terminske posteljice sa skupinom prijevremeno porođenih posteljica. Prijevremeni porodi bili su prosječne gestacijske dobi $34^{+2/7}$ tjedna (u rasponu od $31 - 36^{+5/7}$). Klinički parametri trudnica u skupini prijevremenih poroda nisu se statistički značajno razlikovali od kontrolne skupine zdravih trudnica koje su rodile u terminu, osim po manjem prirastu tjelesne težine što je i očekivano jer je kod njih trudnoća trajala kraće. Tako smo formirali skupinu koju smo u kasnijem radu koristili kao kontrolnu skupinu prijevremenih poroda, kako bismo mogli adekvatno usporediti patološke prijevremeno porođene posteljice s odgovarajućom kontrolnom skupinom uparenom prema gestacijskoj dobi. Takve skupine оформili su i drugi znanstvenici (200, 233). Problem je s tom “kontrolnom” skupinom što vjerojatno postoji neko patološko zbivanje koje je pokrenulo prijevremeni porod, bez obzira jesmo li ga ili nismo uspjeli dokazati uobičajenim kliničkim pokazateljima i PHD nalazom. Stoga smo odlučili definirati kontrolnu skupinu prijevremenih poroda kao onu u kojoj nije bilo ispitivane patologije, dakle porođena djeca su eutrofična za dob a majke nisu imale znakove hipertenzivnog poremećaja u trudnoći. Nisu imale niti povišenu razinu šećera u krvi (testirano OGTT testom). Jednako tako pomoću PHD nalaza isključili smo posteljice s evidentnim znakovima teže infekcije (korioamnionitis), što ipak apsolutno ne isključuje njezino postojanje, te infekcije citomegalovirusom koji mogu utjecati na invazivnost stanica trofoblasta (188).

Uspoređujući skupinu prijevremenih poroda bez pridružene patologije s kontrolnom terminskom skupinom našli smo statistički značajno veću ekspresiju SFRP1 antigena i SFRP3 antigena u prijevremeno porođenim posteljicama bez pridružene patologije nego u kontrolnoj skupini terminskih posteljica, kako ukupno u posteljici, tako i zasebno u korionskim resicama i decidui.

Spomenimo i da je SFRP1 jače izražen u decidui prijevremeno porođenih posteljica dok je ekspresija SFRP3 kod prijevremeno porođenih posteljica veća u korionskim resicama.

6.1.2. Trudnoće sa zastojem u rastu ploda

U daljnjem radu analizirali smo trudnoće sa zastojem u rastu ploda. Osim idiopatskog zastoja, prema pridruženoj patologiji izdvojili smo još i posteljice sa zastojem uz povišeni krvni tlak majke, te sa zastojem uz gestacijski dijabetes majke. Razdvajanje skupina s pridruženom patologijom napravili smo zbog analize mogućeg dodatnog i/ili različitog utjecaja povišenog tlaka ili gestacijskog dijabetesa na posteljice fetusa sa zastojem u rastu.

Kombinirana patologija na ovaj način do sada nije ispitivana, već su pacijentice s kombinacijom više patoloških čimbenika ili isključivane iz studija ili dodatni faktori nisu uzimani u obzir kao mogući uzroci različitih ishoda (180, 233, 235).

U terminskoj i prijevremenoj skupini pacijentica s idiopatskim zastojem u rastu ploda tjelesna visina majki statistički je značajno manja u odnosu na terminsku kontrolnu skupinu. To zapažanje sukladno je činjenici da niže žene rađaju manju, ali zdravu djecu (236). U terminskoj skupini s idiopatskim IUGR manja je i tjelesna težina majke kod poroda kao i prirast tjelesne težine. Pacijentice sa zastojem u rastu ploda uz povišeni tlak majke koje su rodile prijevremeno bile su niže i imale statistički značajno veći BMI prije trudnoće i na porodu. Veći BMI već je opisan u majki s povišenim tlakom u trudnoći i u drugim radovima (233).

U pojedinim smo skupinama zasebno analizirali terminske posteljice i prijevremeno porođene posteljice s istom patologijom. Terminske posteljice uspoređene su s kontrolnom skupinom terminskih posteljica dobivenih iz nekomplikiranih trudnoća, dok su prijevremeno porođene posteljice uspoređene najprije s terminskom, a zatim i s kontrolnom skupinom prijevremeno porođenih posteljica.

Rezultati dobiveni usporedbom **terminskih** posteljica iz trudnoća s **idiopatskim zastojem u rastu ploda, zastojem u rastu uz povišeni krvni tlak te zastojem uz gestacijski dijabetes** s kontrolnom skupinom terminskih posteljica pokazuju statistički značajno veću izraženost SFRP1 i SFRP3 u posteljicama iz patoloških skupina. Možemo stoga zaključiti da je u uzorcima iz terminskih IUGR posteljica značajnije inhibiran prijenos signala Wnt signalnim putem, što može imati za posljedicu slabiju EMT ekstraviloznog trofoblasta. Ovakvi su nalazi sukladni ranijim radovima Hewitt i suradnika, koji su na štakorskom modelu zastoja u rastu detektirali povećanu ekspresiju Sfrp4 proteina u bazalnom

sloju i u labirintu posteljica štakora kod kojih je došlo do smanjenog rasta posteljice. U istim je posteljicama uočen manji ulazak beta katenina u jezgru što odgovara inhibiciji Wnt signalnog puta (237).

U skupini terminskih posteljica dobivenih iz trudnoća u kojoj su djeca imala **kongenitalne anomalije** tjelesne težine djece kao i masa posteljica statistički su značajno manje od istih parametara u kontrolnoj skupini, iako nisu ispod 10. centile za gestacijsku dob, spol i paritetet majke te se ne radi o zastoju u rastu. Ekspresija SFRP1 i SFRP3 proteina statistički je značajno veća u posteljicama plodova s anomalijom nego u kontrolnoj skupini posteljica.

Anomalije spadaju među poznate uzroke sporijeg fetalnog rasta (196). Bez obzira na vrstu anomalije, pojačana ekspresija inhibitora Wnt signalnog puta s posljedično slabijim fetalnim rastom ukazuje na postojanje zajedničkog čimbenika koji doprinosi poremećaju razvoja fetalnih organa i posteljice.

Prijevremeno porođene posteljice s idiopatskim zastojem u rastu ploda te sa **zastojem uz povišeni krvni tlak majke** analizirane su zasebno.

U obje skupine prijevremeno porođenih trudnoća (raspon gestacije 32-36^{+5/7}) našli smo očekivanu statistički značajno veću ekspresiju SFRP1 i SFRP3 u usporedbi s kontrolnim terminskim posteljicama. Međutim, u usporedbi s prijevremenom kontrolnom skupinom nije bilo statistički značajne razlike niti u ekspresiji SFRP1 niti SFRP3 proteina. Prijevremeno porođene patološke posteljice do sada nisu zasebno ispitivane i uspoređivane s kontrolnom skupinom uparenom prema dobi. Posljedica nerazdvajanja posteljica prema gestacijskoj dobi, odnosno uspoređivanje prijevremene patologije s terminskim zdravim kontrolama je nedosljednost rezultata koju su neki autori uočili (233) dok drugi nisu (180).

6.1.3. Trudnoće s hipertenzivnim poremećajem

Slijedeću analiziranu skupinu čine posteljice dobivene iz patoloških trudnoća s hipertenzivnim poremećajem. Također su odvojeno analizirane terminske i prijevremeno porođene posteljice.

Pacijentice s povišenim tlakom koje su rodile u terminu imale su statistički značajno veću tjelesnu težinu i BMI na porodu, kao i BMI prije trudnoće, što je već opisano i u drugim radovima (233) no sam prirast tjelesne težine tijekom trudnoće nije se razlikovao u odnosu na kontrolnu skupinu. Razina šećera u krvi (mjerena OGTT testom između 24. i 28. tjedna

gestacije) u pacijentica koje su rodile u terminu također je bila statistički značajno veća od vrijednosti u kontrolnoj skupini, iako prema kriterijima HAPO studije kod njih nije dijagnosticiran gestacijski dijabetes. Trudnice iz ove grupe koje su rodile prije vremena bile su starije i također su imale statistički značajno veći BMI na porodu u odnosu na kontrolnu skupinu iste gestacijske dobi.

U skupini pacijentica koje su rodile u terminu a u trudnoći su imale samo povišeni tlak, težina djece je statistički značajno manja od težine djece u kontrolnoj skupini, iako prema definiciji ne spadaju u zastoje u rastu (nisu lakša od 10. centile za gestacijsku dob, spol i paritet majke). Budući da su ipak lakša od djece iz kontrolne skupine, moguće je da nisu uspjela ostvariti svoj potencijal rasta a uz to je u njihovih majki zajednički patološki proces doveo do povišenja krvnog tlaka, odnosno ostalih simptoma pridruženih hipertenzivnim poremećajima u trudnoći.

Iz literature je poznato da je za proces EMT karakteristično smanjenje izraženosti adhezivnih molekula E-kadherina (231) a to je potvrđeno u tkivu normalnih posteljica (205). U hipertenzivnim poremećajima ekstravilozni trofoblast ne uspijeva smanjiti sintezu E – kadherina tijekom invazije prstolikih izdanaka u deciduu (174, 206, 207). Izraženost E-kadherina regulirana je Wnt signalnim putem i/ili transkripcijskim faktorom SNAIL (208, 209) čija post-transkripcijska regulacija ovisi o GSK-3 β , članu Wnt signalnog puta i HIF-1 α (200). Povezujući ove navode iz literature s dobivenim rezultatima pojačane izraženosti inhibitora Wnt signalnog puta u posteljicama pacijentica s povišenim tlakom u trudnoći možemo zaključiti da poremećaj EMT ima utjecaja jednako na majku i na fetus. Nepravilan razvoj posteljice vodi do pretjeranog majčinog upalnog odgovora koji je u podlozi poremećene funkcije endotela i pojačane reaktivnosti vaskularnog sustava u preeklampsiji (212, 238). Fetusu pak otežava ostvarenje svog potencijala rasta. Možemo dakle pretpostaviti da su situacije u kojima se zajedno javljaju i povišeni tlak majke i zastoj u rastu ploda samo izraženiji oblik osnovnog poremećaja koji je u podlozi oba patološka stanja.

Poznato je da pacijentice s povišenim tlakom u trudnoći često imaju i gestacijski dijabetes (217) što se objašnjava postojanjem inzulinske rezistencije koja je osnovni patogenetski pokretač obje bolesti (239) svrstane u metabolički sindrom. Porastom tjelesne mase raste rizik pojave metaboličkog sindroma, koji se javlja u sve mlađoj životnoj dobi. Izvan trudnoće, žene s inzulinskom rezistencijom održavaju normoglikemiju povećavanjem sekrecije inzulina. U trudnoći, ta kompenzatorna hiperinzulinemija više nije dovoljna za

održanje normalne glikemije jer trudnoća i u zdravih trudnica ima dijabetogeno djelovanje zbog djelovanja kontrainzulinskih hormona posteljice (240). S druge strane, hiperinzulinemija smanjuje izlučivanje natrija putem bubrega što dovodi do hipernatrijemije i stimulira simpatikus uz povišenje razine noradrenalina. Povišen natrij, uz kalcij pojačava osjetljivost glatkih mišića krvnih žila na noradrenalin i angiotenzin, a inzulin kao čimbenik rasta dovodi do hipertrofije stijenke krvnih žila sa suženjem lumena. Sve navedeno vodi do vazokonstrikcije, a zbog smanjenog ukupnog volumena plazme uzrokovanog povećanom propusnošću endotela dolazi do hipovolemije, hemokoncentracije i otežane perfuzije posteljice s oslobađanjem faktora koji aktiviraju endotel te djeluju na pojavu preeklampsije (217, 239). Analiza naših trudnica ukazuje na isti proces – u skupini onih koje su imale samo povišeni tlak, razina šećera u krvi bila je viša nego u kontrolnoj skupini iako se kod njih još nije razvio gestacijski dijabetes, a djeca su im bila manje porođajne težine, iako ne ispod 10. centile. Pacijentice u terminskoj i prijevremeno porođenoj skupini u kojoj je povišeni tlak kombiniran s gestacijskim dijabetesom imale su statistički značajno veću tjelesnu težinu i BMI na porodu, kao i BMI prije trudnoće, što se također uklapa u sliku inzulinske rezistencije (233,239). Moguće je dakle razmišljati o povezanosti sva tri entiteta patološke trudnoće (hipertenzivni poremećaj, IUGR, gestacijski dijabetes) putem zajedničke patofiziološke osnove. Tome u prilog govore naši rezultati. SFRP1 i SFRP3 proteini podjednako su povišeni u uzorcima posteljica iz trudnoća kompliciranih povišenim tlakom majke, bez obzira je li trudnica dodatno bolovala od gestacijskog dijabetesa ili ne, odnosno je li postojao zastoj u rastu ploda ili nije.

6.1.4. Gestacijski dijabetes

Budući da se tijekom prikupljanja uzoraka uz ranije definiranu patologiju (zastoj u rastu ploda i povišeni tlak majke) često pridruživao i gestacijski dijabetes zasebno smo analizirali i skupinu prijevremeno porođenih posteljica iz trudnoća kompliciranih samo gestacijskim dijabetesom. U usporedbi s terminskim kontrolama, statistički je značajno veća izraženost SFRP1 i SFRP3 ukupno i u decidui, što je sukladno nalazima u svim drugim prijevremeno porođenim skupinama. Međutim, u korionskim resicama SFRP3 je očekivano jače izražen u odnosu na resice terminskih kontrolnih posteljica, ali nema statistički značajne razlike u izraženosti SFRP1 proteina. Nasuprot tome, u usporedbi s prijevremenim kontrolama, nema razlike u izraženosti SFRP1 i SFRP3 u decidui niti ukupno u posteljici (kao niti u drugim skupinama prijevremenih posteljica), ali postoji statistički značajna razlika u

korionskim resicama u kojima su inhibitori Wnt signalnog puta statistički značajno manje izraženi.

Manja inhibicija Wnt signalnog puta u korionskim resicama posteljica iz trudnoća kompliciranih samo gestacijskim dijabetesom moguć je razlog većem rastu i većoj masi posteljica u dijabetičnih trudnica.

6.1.5. Međusobna usporedba analiziranih skupina posteljica

Budući da su SFRP 1 i SFRP 3 proteini sličnog biološkog djelovanja, očekivali smo da nalazi proteina SFRP3 budu sukladni s nalazima SFRP 1. Osim toga, ako pretpostavimo da je u podlozi zastoja u rastu ploda i hipertenzivnih poremećaja u trudnoći isti patofiziološki proces, skupine patoloških posteljica ne bi se trebale međusobno razlikovati u ekspresiji inhibitora Wnt signalnog puta.

6.1.5.1. Patološke terminske posteljice

Statistički značajno izraženiju ekspresiju SFRP1 i SFRP3 antigena izmjerili smo u svim ispitivanim skupinama patoloških terminskih posteljica u odnosu na kontrolnu skupinu terminskih posteljica.

Analizirajući izmjerene vrijednosti volumenske gustoće SFRP1 i SFRP3 antigena uočili smo sličnost terminske patologije s prijevremeno porođenim kontrolnim posteljicama. Stoga smo terminsku patologiju usporedili s prijevremeno porođenim posteljicama bez pridružene patologije.

Takvom usporedbom nismo našli statistički značajnu razliku u ukupnoj kao niti u zasebnoj ekspresiji SFRP1 antigena u resicama i decidui između terminske patologije i prijevremenih kontrola.

Ekspresija SFRP3 u decidui terminskih patoloških posteljica također se nije statistički razlikovala od ekspresije istog antigena u prijevremenim kontrolnim posteljicama. Neočekivano je (i različito od SFRP1) da je u korionskim resicama bila statistički značajno manja u patološkim terminskim posteljicama nego u resicama kontrolnih prijevremenih posteljica, osim u skupini s idiopatskim zastojem u rastu gdje razlike nije bilo ($p < 0,05$; Kruskal Wallis ANOVA).

Također smo međusobno usporedili skupine posteljica dobivene iz terminskih patoloških trudnoća te među njima nismo dobili statistički značajnu razliku ni u decidui i resicama zasebno, niti u ukupnoj ekspresiji SFRP 1 i SFRP3 antigena, kao što smo i očekivali.

6.1.5.2. Patološke prijevremeno porođene posteljice

Statistički značajno izraženiju ukupnu ekspresiju SFRP1 i SFRP3 antigena, kao i zasebno u decidui izmjerili smo u svim ispitivanim skupinama patoloških prijevremeno porođenih posteljica u odnosu na kontrolnu skupinu terminskih posteljica.

Uspoređujući skupine prijevremeno porođenih patoloških posteljica s prijevremenom kontrolnom skupinom uparenom prema gestacijskoj dobi nismo našli statistički značajnu razliku u ukupnoj ekspresiji SFRP1 niti SFRP3 antigena.

Manja ekspresija SFRP1 u odnosu na prijevremene kontrole uočena je u korionskim resicama prijevremeno porođenih posteljica trudnica koje su imale samo gestacijski dijabetes, o čemu je već bilo riječi ranije. U patološkim prijevremeno porođenim posteljicama detektirali smo statistički značajno veću ekspresiju SFRP1 u resicama u odnosu na terminsku kontrolu, osim skupine s gestacijskim dijabetesom u kojoj nije bilo značajne razlike. Za razliku od SFRP1, kod kojeg su nalazi potvrdili našu hipotezu, ekspresija SFRP3 u korionskim resicama posteljica iz trudnoća s idiopatskim IUGR, povišenim krvnim tlakom i eutrofičnom djecom te povišenim tlakom i dijabetesom bila je suprotno očekivanju statistički značajno manja u odnosu na prijevremene kontrole ($p < 0,05$; Kruskal Wallis ANOVA).

Također smo međusobno usporedili skupine posteljica dobivene iz prijevremeno porođenih patoloških trudnoća. Najjače je izražena ekspresija SFRP1 antigena u decidui, resicama te ukupno u terminskim i prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s povišenim tlakom uz gestacijski dijabetes. Iz navedenog bismo mogli zaključiti da u kombinaciji povišenog tlaka majke i gestacijskog dijabetesa postoji pojačana inhibicija u odnosu na pojedinačne patološke faktore.

Uspoređujući ekspresiju SFRP1 u decidui u odnosu na ekspresiju u korionskim resicama u pojedinim skupinama posteljica, statistički značajnu razliku našli smo samo u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća s gestacijskim dijabetesom ($p < 0,0001$), gdje je izraženost u korionskim resicama manja, dok razlika u svim ostalim skupinama patoloških posteljica nije bila statistički značajna.

Statistički je značajno veća ekspresija SFRP1 i SFRP3 u prijevremeno porođenim posteljicama bez pridružene patologije u odnosu na zdrave terminske posteljice. Uz to,

ekspresija SFRP1 jače je izražena u decidui prijevremeno porođenih posteljica dok je SFRP3 jače izražen u korionskim resicama.

6.1.6. Kako objasniti ovakve rezultate?

Inhibicija signalnog puta Wnt rezultira degradacijom β - katenina u destruktivskom kompleksu i izostankom aktivnosti o β -kateninu ovisnih gena poput TCF/LEF (geni koji stimuliraju migraciju i invaziju) (9). Budući da je invaziju trofoblasta potrebno prostorno i vremenski ograničiti, posteljice iz normalnih trudnoća trebale bi imati izražen mehanizam ograničavanja invazije u određenom razdoblju trudnoće. Nepostojanje ili neuspješna izraženost takvog mehanizma rezultiralo bi pretjeranim urastanjem posteljičnog tkiva u uterus (placenta akreta, inkreta, perkreta). Logično je za pretpostaviti da bi se mehanizam zaustavljanja prodora trofoblasta trebao jače izraziti u majčinskom dijelu posteljice, dakle decidui.

Xu i suradnici su istražujući ovaj mehanizam zaključili da u decidui postoji negativna regulacija invazije pomoću transformirajućeg faktora rasta beta (*engl. transforming growth factor beta*, TGF β) koji inhibira proliferaciju, migraciju i invazivnost stanica EVT prvog tromjesečja trudnoće *in vitro* (241). Decidua također stvara dekorin (*engl. decorin*), proteoglikan koji veže TGF β (i u nekim ga slučajevima inaktivira) a koji je raspoređen na istim mjestima kao i TGF β u ekstracelularnom matriksu decidue. Utvrdili su da dekorin blokira proliferaciju EVT uzrokujući pojačanu produkciju proteina p21. Dekorin i TGF β svaki za sebe imaju antimigratorni i antiinvazivni učinak na stanice EVT, odnosno proliferacija, migracija i invazivnost stanica EVT u decidui kontrolirana je pomoću dva decidualna produkta, TGF β i dekorina. Pretpostavljaju i da dekorin u ekstracelularnom matriksu služi kao “spremište” za TGF β u neaktivnom stanju (241). Aktivira se proteolitičkim mehanizmima ekstraviloznog trofoblasta (matriks metaloproteinaze 2, 3 i 7) koji ga odvajaju iz kompleksa s dekorinom te tako lokalno sprječava pretjeranu invaziju (241, 242). Dekorin je izoliran i iz resica terminskih posteljica, a smatra se da tamo ima antitrombotičnu funkciju (243).

Borbely i suradnici su ispitivali dekorin (dermatan sulfat proteoglikan II) i biglikan (*engl. biglycan*) koji je također član obitelji malih proteoglikana bogatih leucinom (*engl. small leucine-rich proteoglycan family*) koji se nalaze u ekstracelularnom matriksu i na staničnoj površini, u posteljicama različite gestacijske dobi, urasloj posteljici, invazivnoj moli

i koriokarcinomu. Oba su proteoglikana bila izražena u EVT prvog tromjesečja i u svim ispitivanim patološkim oblicima, no ne i u terminskim posteljicama. U ekstracelularnom matriksu zdravih i patoloških posteljica nađen je biglikan, dok je dekorin izražen samo u ECM terminskih posteljica. Zaključili su da je istovremena izraženost oba proteoglikana specifična za stanice EVT i ovisna o gestacijskoj dobi kod normalnih trudnoća, te povezana s invazivnom sposobnošću EVT u patološki invazivnim posteljicama (244).

Tantbirojn i suradnici su u slučajevima placente akrete utvrdili smanjen udio remodeliranih krvnih žila, od kojih neke pokazuju patološke promjene. Remodeliranje krvnih žila zahvatilo je žile dublje u miometriju, a intersticijski trofoblast invadirao je dublje u stijenku maternice. Zaključili su da je patogeneza uraslih posteljica povezana s pojačanom ali nepotpnom invazijom trofoblasta u područjima u kojima je decidua nerazvijena, odnosno gdje postoji njezino oštećenje ili ožiljak, koji omogućuje pristup korionskim resicam dublje u stijeku uterusa (245). Njihovi su nalazi u suglasju s radom Hannon i suradnika, koji su također opisali nedostatno remodeliranje spiralnih arterija u placenti akreti u slučajevima s nedostatkom decidue, kao i povećan broj stanica intersticijskog EVT u toj skupini (246). Uz to, Laban i suradnici su utvrdili statistički značajan manjak decidualnih NK stanica u bazalnoj decidui urasle posteljice u odnosu na normalne posteljice (247).

Navedeni radovi naglašavaju važnost decidue u kontroli invazije trofoblasta i fiziološkoj pretvorbi spiralnih arterija. Xu i suradnici nastojali su odgovoriti na pitanje je li postizanje invazivne sposobnosti rezultat krajnje diferencijacije stanica trofoblasta. Proučavanjem markera povezanih s proliferacijom utvrdili su da je proliferativna aktivnost najveća na bazi izdanaka ekstraviloznog trofoblasta, a pada nakon invazije u deciduu (241). Ovo su opažanje mogli objasniti na dva načina – progresivnom diferencijacijom trofoblasta prema invazivnom fenotipu s usputnim gubitkom proliferativne sposobnosti ili negativnom regulacijom proliferacije faktorima iz decidue. Studije na modelima *in vitro* pokazale su da je proliferativna, invazivna i migratorna sposobnost trofoblasta regulirana *in situ* autokrinim i parakrinim faktorima (62, 248, 249, 250, 251) poput faktora rasta, proteina koji vežu faktore rasta i proteoglikanima, kao i sastavnicama ekstracelularnog matriksa koji djeluju na receptore i vezna mjesta na površini stanica EVT (68, 70, 252, 253, 254). U svome radu definirali su dva regulatora proizvedena u decidui – TGF β i dekorin (dermatan sulfat proteoglikan II) te su progresivno smanjenje sposobnosti proliferacije stanica EVT u decidui objasnili specifičnom negativnom regulacijom odnosno djelovanjem antiproliferativnih faktora iz decidue (241). Iozzo i suradnici pretpostavili su da dekorin djeluje preko receptora

za epidermalni faktor rasta (*engl. epidermal growth factor receptor*; EGF-R) te tako povisuje razinu Ca^{++} u citosolu (255) i suprimira rast stanica karcinoma *in vitro* (256). Stanice EVT imaju EGF-R i reagiraju pojačanom proliferacijom na različite EGF-R ligande poput EGF ili TGF- α (257). TGF- α djeluje na autokrini i parakrini način. Stoga je moguće da dekorin djeluje kao antagonist na EGF-R te tako ispoljava svoju antiproliferativnu aktivnost. Moguće je također da dekorin djeluje i preko drugih, još neistraženih receptora. Jednako tako, mehanizmi kojima dekorin ispoljava svoje antimigratorno i antiinvazivno djelovanje još nisu poznati, no predložen je dvostruki mehanizam: sudjelovanje u adhezivnim reakcijama fibronektina ili direktno vezanje na fibronektin. Stanice EVT *in vitro* stvaraju fibronektin (258), a dostupnost $\alpha 5 \beta 1$ integrina (receptor za fibronektin) na staničnoj površini ključna je za migratornu funkciju EVT (259, 260).

Za razliku od normalnih stanica EVT, stanice koriokarcinoma refraktorne su na antiproliferativnu, antimigratornu i antiinvazivnu funkciju dekorina i TGF β (241, 261). Autori zaključuju da su tako stanice karcinoma otporne na djelovanje molekularnih “kočnica” u decidui. Međutim možda bismo mogli pretpostaviti i drugačiji način razmišljanja. Neupitno je da decidua stvara molekule koje ograničavaju invaziju EVT. Jednako tako, dokazano je da stvara faktore koji imaju antiproliferativnu aktivnost. Zaključak je ranije navedenih radova da je uloga decidue negativna regulacija invazije. Možemo li pretpostaviti obrnuto? Da je uloga decidue, barem u ranoj trudnoći, proizvesti faktore koji će svojim antiproliferativnim djelovanjem (izdvajanjem stanica iz ciklusa dijeljenja i obnavljanja populacije) pospješiti diferencijaciju trofoblasta u invazivni EVT koji je potreban za formiranje placente i fiziološku pretvorbu spiralnih arterija? Podatak da dekorin i TGF β nemaju utjecaja na proliferaciju i invaziju stanica koriokarcinoma govorio bi u prilog takvom razmišljanju, tim prije što oba faktora djeluju na navedene sposobnosti u staničnim linijama drugih karcinoma i osteosarkoma (256, 262, 263, 264). Pretpostavljanje antitrombotične funkcije dekorina u resicama terminskih trudnoća također upućuje na njegovu funkciju u održavanju fetomaternalnog krvotoka. Opažanja da nedostatak decidue rezultira uraslom posteljicom u kojoj je remodeliranje krvnih žila neadekvatno, a broj stanica intersticijskog EVT veći, također može upućivati ne samo na nedostatak negativne regulacije invazije, nego i na neadekvatnu diferencijaciju zbog nedostatka faktora koje proizvodi decidua, zbog čega je održana proliferacija stanica intersticijskog EVT, a smanjena diferencijacija u invazivni endovaskularni EVT koji bi trebao adekvatno remodelirati spiralne arterije u decidui i unutrašnjoj trećini miometrija.

Pretjerana invazija trofoblasta kod placente previje također se povezuje sa smanjenim udjelom ispravno remodeliranih krvnih žila, te se opisuje kao kompenzatorni mehanizam kojem je cilj zadovoljiti metaboličke potrebe i potrebe za kisikom fetusa u razvoju (265). Nepravilan razvoj resica i neadekvatno izlučivanje posteljičnog VEGF (*engl. vascular endothelial growth factor*), PlGF (*engl. Placental growth factor*) i sFlt1 (*engl. soluble fms-like tyrosine kinase 1*) uključeni su u patološka stanja trudnoće poput preeklampsije i zastoja u fetalnom rastu. Njihova je transkripcija regulirana hipoksijom, koja je izgledna u donjem uterinom segmentu ili na ožiljku uterusa (predisponirajućem faktoru za previju). Lokalna koncentracija kisika značajna je za proliferaciju EVT kao i za ekspresiju VEGF (266, 267, 268), a normalna invazija trofoblasta zahtijeva koordinaciju između VEGF, PlGF i njihovih receptora VEGFR-1 (Flt-1) i VEGFR-2 (Flk-1) koji su prisutni u decidui. Moguće je da hipoksija stimulira invaziju dok se ne zadovolje potrebe posteljice i fetusa. Kada se to postigne, negativna regulacija gena *VEGF* trebala bi spriječiti daljnju invaziju miometrija odnosno imati protektivnu ulogu. U slučajevima previje, akrete ili inkrete, zadovoljavajuća oksigenacija postiže se tek nakon duboke invazije miometrija pa čak i visceralnih organa (perkreta). Druga je mogućnost abnormalna diferencijacija trofoblasta koja vodi do pretjerano invazivnog fenotipa. Decidua se suprotstavlja ekspanzivnoj prorodi i EVT aktivirajući tkivne inhibitore matriks metaloproteinaza. Wehrum i suradnici pokazali su da normalni invazivni EVT ne izražava mezenhimske markere poput vimentina, nego zadržava epitelne karakteristike poput citokeratina (69, 265). Moguće je da zadržavanje epitelnih markera osigurava da se diferencijacija odvija do granice koja ograničava invaziju podležućih tkiva (265). Deficijentna decidualizacija ili nepostojanje decidue zbog ožiljaka onemogućuje komunikaciju između stanica EVT i staničnih i izvanstaničnih komponenti decidue koji modeliraju stanični rast i invaziju. Bandeira i sur. opisuju faktor CRIPTO-1 (član obitelji epidermalnog faktora rasta koji imaju specifičnu kriptu domenu) u stanicama EVT koje su neproliferativne i imaju niski apoptotički indeks u kasnijim stadijima trudnoće (269). CRIPTO-1 doprinosi invazivnosti i/ili staničnom preživljenju EVT. Djeluje putem PI-3K signalnog puta i uključuje AKT (*engl. protein kinase B, PKB/AKT*) i GSK-3 β (270) koji su aktivni u stanicama EVT. CRIPTO-1 je izražen u u ležištu terminskih placenti i u uraslim posteljicama. U uraslim posteljicama izraženost CRIPTO-1 je jača u stanicama trofoblasta, ali i u endotelnim stanicama te u stanicama miometrija. Osim toga, sloj trofoblasta je u tim posteljicama deblji, i raste u otocima poput epitelnih stanica, slično kao u prvom tromjesečju normalnih posteljica (268), ali ne i u trećem trimestru. Uglavnom, stanice

ekstraviloznog trofoblasta u uraslim posteljicama su zadržale morfološke karakteristike ranijih stadija trudnoće. Ovaj nalaz može dijelom objasniti abnormalnu invaziju u uraslim posteljicama (265). CRIPTO-1 je također reguliran pomoću TGF β i BMP (*engl. Bone morphogenic protein*), koji se nalaze u endometralnim stanicama. TGF β pojačava izražaj CRIPTO-1 dok ga BMP smanjuje (271). Ravnoteža ova dva faktora može biti promijenjena zbog nerazvijenosti ili defekata u decidui (265).

Normalne (kontrolne) trudnoće (bez zastoja i tlaka) koje završe prijevremenim porodom trebale bi ispoljiti taj mehanizam zaustavljanja invazije u određenoj dobi trudnoće. Moguće je pretpostaviti da je pojačana izraženost inhibitora Wnt signalnog puta u prijevremeno porođenim posteljicama, a osobito u decidui tih posteljica jedan od mehanizama zaustavljanja invazivnog ponašanja stanica trofoblasta.

Analizirajući izmjerene vrijednosti volumenske gustoće SFRP1 i SFRP3 antigena uočili smo sličnost terminske patologije s prijevremeno porođenim kontrolnim posteljicama.

Budući da su isti inhibitori Wnt signalnog puta povišeni u terminskim posteljicama kod zastoja u rastu ploda i povišenog tlaka majke, znači li to da one ispoljavaju “nezreli” obrazac ponašanja, odnosno da nisu uspjele u pravom trenutku smanjiti izraženost inhibitora Wnt signalnog puta i omogućiti daljnji nesmetani razvoj posteljice? Pritom treba napomenuti da su “kontrolne” prijevremeno porođene posteljice gestacijske dobi 31-36^{+5/7} tjedana. To je razdoblje u kojem je u najvećoj mjeri već završen razvoj posteljice, te se samo povećava već stvorena masa posteljičnog tkiva. Zbog toga bi se u normalnim trudnoćama razina inhibitora Wnt signalnog puta u terminu u decidui mogla smanjivati jer se više ne očekuje daljnji prodor trofoblasta, nego samo povećanje njegove mase i diferencijacija resica. Daljnje održavanje inhibitora Wnt signalnog puta na visokoj razini u patološkim trudnoćama u terminu ukazuje na trajnu “obranu” majke od invazije ekstraviloznog trofoblasta.

Na posteljicama miševa Hewitt i suradnici su ispitivali distribuciju inhibitora Wnt (u ovom slučaju SFRP4) u dva sloja štakorske posteljice (bazalna zona i labirint), koje odgovaraju decidui i resicama kod ljudi (237). Bazalna zona u zadnjoj trećini trudnoće ne raste i u njoj je izražena apoptoza, dok labirint intenzivno raste. Analiza je pokazala značajan porast ekspresije SFRP4 u bazalnoj zoni blizu termina (proapoptotična aktivnost) ali ne i u brzorastućem labirintu. U razdoblju maksimalog fetalnog i placentnog rasta SFRP4 je jako izražen u stanicama trofoblasta u bazalnoj zoni (uloga u ograničavanju invazije?) a minimalno u brzo rastućem labirintu (potreba za proliferacijom stanica). Imunohistokemijski je

lokaliziran na staničnoj membrani trofoblasta i u ekstracelularnom prostoru oko stanica trofoblasta u bazalnoj zoni te minimalno u labirintu. Antiproliferativno djelovanje SFRP4 pokazano je i kod mezotelioma (272) te uterinih i kolorektalnih karcinoma (273).

Autori zaključuju da ekspresija SFRP 4 značajno raste blizu termina u neproliferirajućem tkivu posteljice (bazalnoj zoni) ali ne u brzorastućem labirintu. Takva ekspresija povezana je s usporenjem rasta određenih dijelova posteljice u normalnoj trudnoći. U štakorskom IUGR modelu ekspresija SFRP4 pojačana je i u labirintu te zaključuju da SFRP4 ima antiproliferativnu i proapoptotičnu ulogu u IUGR posteljicama. Promjene u lokalizaciji β katenina ukazuju da SFRP4 inhibira Wnt signalni put u stanicama trofoblasta i tako utječe na rast posteljice (237). Budući da Wnt signalni put promiče angiogenezu poticanjem ekspresije VEGF (274), porast inhibitora tog puta u labirintu IUGR posteljica će je umanjiti, što je također mogući uzrok poremećene placentacije.

Sukladno nalazima na štakorskoj posteljici, mogli bismo pretpostaviti da se jača izraženost inhibitora Wnt signalnog puta u decidui prijevremeno porođenih ljudskih posteljica u odnosu na terminske kontrole može objasniti na isti način. U terminskim posteljicama i u našim smo uzorcima dobili jaču ekspresiju SFRP1 u neproliferirajućem tkivu posteljice (bazalnoj decidui) nego u rastućim korionskim resicama.

Za razliku od prijevremeno porođenih posteljica bez pridružene patologije, u posteljicama s IUGR (bez tlaka i s pridruženim tlakom), ekspresija SFRP1 je podjednako izražena i u decidui i u resicama. Možemo pretpostaviti da SFRP1 blokadom Wnt signalnog puta ima antiproliferativnu (anti –EMT) ulogu i u ljudskim IUGR posteljicama.

Zhang Z. i suradnici su u svom radu iz 2013. godine ispitivali izraženost Wnt2 i SFRP4 u ljudskim posteljicama trećeg tromjesečja trudnoće komplicirane preeklampsijom. Imunohistokemijski su detektirali jače izražen Wnt2 u kontrolnoj skupini, dok je SFRP4 bio jače izražen u grupi s preeklampsijom. Zaključili su da smanjena izraženost Wnt2 a povišeni SFRP4 mogu biti povezani s patogenezaom teške preeklampsije (233). Rezultati naših ispitivanja posteljica iz trudnoća s hipertenzivnim poremećajem u trudnoći pokazuju jednako povišenje razine proteina SFRP1 i SFRP3 i u skladu su s njihovim istraživanjem.

Normalni razvoj posteljice zahtijeva brzi rast i vaskularizaciju majčinih i fetalnih krvnih prostora, dok je kod zastoja u rastu taj proces otežan. Zhang X. i suradnici (274) pretpostavili su da Wnt signalni put može imati ulogu u poticanju angiogeneze putem poticanja ekspresije VEGF (*engl. vascular endothelial growth factor*). Pojačana izraženost inhibitora Wnt signalnog puta mogao bi, shodno tome, smanjiti ekspresiju VEGF u

korionskim resicama. U istraživanjima na modelu IUGR na štakorskoj posteljici pokazala se smanjena ekspresija Vegf/ mRNA u labirintu (237).

Međutim, analizirajući ekspresiju SFRP3 proteina u korionskim resicama prijevremeno porođenih patoloških posteljica, našli smo neočekivano manje izražen taj protein u odnosu na resice kontrolne skupine prijevremenih poroda.

Ispitivanja SFRP3 proteina u stanicama bubrežnog tkiva i stanicama karcinoma bubrega pokazala su visoku razinu u normalnom tkivu bubrega, nisku u stanicama primarnog karcinoma te visoku u metastatskom tkivu (275). Hirata i suradnici proveli su niz eksperimenata kojima su pokazali da uz SFRP3 raste broj viabilnih i invazivnih stanica, formiraju se tubularne strukture, a smanjuje se broj apoptoza u stanicama tumorskog tkiva *in vitro*. Pospješeno rasta tumora nađeno je i kod *nude* miševa kojima su implantirane stanice tumorskog tkiva iste stanične linije u kojoj suproveli transfekciju gena za SFRP3. Nasuprot tome, broj viabilnih i invazivnih stanica se smanjio u stanicama u kojima je onemogućena translacija mRNA u protein SFRP3. Također se pokazalo da SFRP3 u tim staničnim linijama utječe na pojačano prepisivanje gena za matriks metaloproteinazu 3 (MMP-3) i ligand iz obitelji angiopoetin ANGPT-1 (*engl angiopoetin-1.*), te da vjerojatno potiče angiogenezu putem angiopoetina , a ne putem VEGF, premda mehanizmi tog djelovanja još nisu rasvijetljeni. Svojim su pokusima Hirata i suradnici po prvi put pokazali da SFRP3 može poticati rast i invazivnost stanica te inhibirati apoptozu, barem što se tiče stanica karcinoma bubrega (275). Iz navedenog bismo mogli zaključiti, da SFRP3, kao marker epitelnog ponašanja stanica, u određenim okolnostima usmjerava tkivo u proliferaciju (kao u metastazama, gdje je jako izražen), a ne u diferencijaciju. Primijenimo li ove spoznaje na tkivo trofoblasta, odnosno posteljicu, mogli bismo zaključiti da je visoka razina SFRP3 u korionskim resicama prijevremeno porođenih posteljica izraz istog principa poticanja proliferacije u razdoblju najvećeg rasta posteljice. Posteljice iz patoloških prijevremeno porođenih trudnoća pokazuju manju ekspresiju SFRP3 antigena u korionskim resicama, pa možda i to, uzevši u obzir ranije navedene činjenice, doprinosi njihovom slabijem rastu i lošijoj prokrvljenosti. U tom svjetlu, logična je i manja ekspresija SFRP3 u korionskim resicama zdravih terminskih posteljica, u kojima više nema potrebe za daljnjom proliferacijom i angiogenezom.

Inhibitorna aktivnost SFRP3 je specifična, jer on blokira prijenos signala pomoću Wnt-1 i Wnt-8, ali ne i pomoću Wnt-3A (276), na koji djeluje SFRP1 niti Wnt-5A koji stimulira nekanonski Wnt/Ca⁺⁺ put (277).

SFRP 3 antagonizira i signalne putove koje posreduju Wnt-4 i Wnt-7 (278). Stoga je razliku u ekspresiji ovih proteina u korionskim resicama odnosno decidui moguće povezati s djelovanjem na različite ligande ili receptore.

U stanicama kolorektalnog karcinoma *in vitro* SFRP1, SFRP2 i SFRP5 inhibiraju rast tumora suprimirajući gen *c-myc* i inducirajući apoptozu tih stanica (279). Isto tako, SFRP1 potiče apoptozu u stanicama karcinoma dojke (280) a SFRP3 suprimira rast tumora i invazivnost stanica karcinoma prostate (281). Međutim, proteini SFRP 1 i SFRP3 su povezani s proliferacijom i smanjenom apoptozom metastatskih stanica renalnog karcinoma (275, 282, 283), a SFRP 3 i s poticanjem rasta rabdomiosarkoma (284) - supresija SFRP3 smanjuje rast rabdomiosarkoma a povećava miogenu diferencijaciju. Neki radovi govore u prilog teoriji da SFRP3 inhibira stvaranje metaloproteinaza (MMP-2 i MMP-9) (281, 285). dok drugi govore u prilog teoriji Foronjija i suradnika koji su pokazali da SFRP1 povećava stvaranje MMP-1 i MMP-9 u pneumocitima i epitelu bronhiola (286). Osim toga, proučavajući mišje zametke, utvrdili su da je SFRP1 prisutan u točno određenom razdoblju razvoja pluća. Stoga su zaključili da mehanizmi potaknuti djelovanjem SFRP1, koji u plućima odraslih osoba imaju destruktivno djelovanje, u točno određenom dobu embriogeneze imaju pozitivno djelovanje na remodeliranje tkiva pomoću proteaza, koje je potrebno za razvoj pluća zametka. Ovo istraživanje nam nudi još jedno moguće objašnjenje za različitu ekspresiju SFRP1 i SFRP3 u prijevremenim i terminskim posteljicama. U točno određenom razdoblju trudnoće ovi proteini imaju pozitivnu ulogu u razvoju i rastu posteljice, koja se mijenja s gestacijskom dobi. Održavanje njihove funkcije nakon razdoblja njihovog optimalnog učinka može biti podloga patološkim promjenama u trudnoći.

Navedene studije ukazuju da SFRP1 i SFRP3 imaju važne uloge u staničnoj proliferaciji i diferencijaciji različitih tkiva. Stoga bismo ih prije mogli nazvati modulatorima, a ne nužno inhibitorima Wnt signalnog puta.

Značajno je pitanje je li pojačana izraženost inhibitora Wnt signalnog puta u patološkim trudnoćama u terminu patološki odgovor ili neadekvatna prilagodba na prodor trofoblasta u tkivo majke? Jedno ne mora isključiti drugo. Moguće je da je veća ekspresija inhibitora Wnt signalnog puta u neterminskim posteljicama odraz fiziološkog procesa adaptacije na prodor stranog tkiva, a u (barem nekim) patološkim trudnoćama nemogućnosti organizma da na vrijeme zaustavi taj inače fiziološki proces.

6.2. TCF1

Učinak Wnt signalnog puta ogleda se u oslobađanju β katenina iz destruktivnog kompleksa, njegovom nakupljanju u citoplazmi i ulasku u jezgru stanice gdje kao koaktivator omogućuje TCF/LEF faktorima pokretanje prepisivanja ciljnih gena, te tako potiče proliferaciju i diferencijaciju stanica trofoblasta (287, 288) i njihovo preživljavanje (289). TCF je uglavnom izražen u invazivnom trofoblastu (18). Inhibicija signalnog puta djelovanjem SFRP potiče razgradnju β katenina pomoću destruktivnog proteinskog kompleksa i time umanjuje mogućnost njegovog prelaska u jezgru.

U našem radu očekivali smo smanjenu izraženost proteina TCF1 u posteljicama iz patoloških trudnoća. Smanjenu izraženost transkripcijskih faktora potrebnih za prepisivanje gena zaduženih za invazivnost i migraciju trofoblasta povežemo s neuspješnom EMT tih stanica.

Ekspresiju TCF1 antigena detektirali smo u decidui humanih posteljica. TCF1 je bio pozitivan u jezgrama ekstraviloznih intermedijarnih trofoblasta koji invadiraju u deciduu. Time smo pokazali da se aktivna transkripcija odvija u stanicama koje poprimaju mezenhimne karakteristike, kao što je slučaj sa stanicama ekstraviloznog intermedijarnog trofoblasta.

Usporedili smo medijane pojedinih skupina ispitivanih posteljica. Između kontrolnih terminskih posteljica i kontrolnih prijevremenih posteljica nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji TCF1.

Uspoređujući kontrolne terminske i prijevremene posteljice s patološkim terminskim i prijevremeno porođenim ispitivanim skupinama, dobili smo statistički značajnu razliku samo u skupinama prijevremeno porođenih posteljica iz trudnoća kompliciranih gestacijskim dijabetesom, s i bez povišenog tlaka majke ($p < 0,05$; Kruskal Wallis ANOVA). Ostale

ispitivane skupine nisu pokazale statistički značajnu razliku niti u usporedbi s terminskim, niti prijevremeno porođenim kontrolama.

Najslabija ekspresija TCF1 nađena je u terminskom zastoju u fetalnom rastu uz povišeni tlak majke. Premda statistički nema značajne razlike u odnosu na terminsku kontrolnu skupinu, posteljice iz trudnoća s IUGR uz povišeni tlak majke imaju statistički značajno manje izražen TCF1 antigen u odnosu na prijevremene kontrole. U slučaju TCF1 nismo naišli na sličnost terminske patologije s prijevremeno porođenim kontrolnim posteljicama, kao u slučaju SFRP1 i SFRP3.

Uspoređujući patološke skupine posteljica međusobno, našli smo najizraženiju ekspresiju TCF1 antigena u posteljicama iz trudnoća kompliciranih gestacijskim dijabetesom s i bez povišenog tlaka majke.

Gestacijski dijabetes je metabolički poremećaj koji se javlja tijekom trudnoće zbog nemogućnosti majčine gušterače da odgovori povećanim potrebama za inzulinom koje se javljaju od drugog tromjesečja trudnoće (290). Majčin dijabetes stvara nepovoljno okruženje za razvoj fetusa i posteljice. Mehanizmi koji dovode do poremećaja u posteljici dijabetičnih majki nisu posve objašnjeni, ali postoje radovi koji ukazuju na promjene proliferacije, apoptoze i kontrole staničnog ciklusa u stanicama trofoblasta (291, 292, 293). Kod eksperimentalnog modela štakora pokazalo se da dijabetes dovodi do zadebljanja bazalne zone posteljice povećavajući nakupljanje glikogena i gigantskih stanica trofoblasta (294). Također je opisana pojačana ekspresija markera proliferacije u bazalnoj zoni i u labirintu (291, 293). Pokazalo se da dijabetes pojačava proliferaciju stanica čime se može objasniti placentomegalija u dijabetičnih životinja (293). Kod ljudi, placente iz trudnoća s gestacijskim dijabetesom mogu biti teže od zdravih kontrola (295), no to uvelike ovisi o nadzoru glikemije, odnosno liječenju pa se u slučaju dobre regulacije šećera u krvi težina posteljice ne mora razlikovati od zdravih kontrola (296). Mehanizam povećanja mase posteljice nije poznat. Opaženo je povećanje površine kapilara i stvaranje novih krvnih žila u dijabetičkim posteljicama (296), no moguće je naći i područja sa smanjenim brojem krvnih kapilara (296). U oko 60% dijabetičkih posteljica može se uočiti nezrelost resica koju karakterizira porast broja nezrelih i zrelih intermedijarnih resica (296,297). U dijabetičnim je posteljicama opisana pojačana proliferativna aktivnost viloznog citotrofoblasta u usporedbi s kontrolnim zdravim posteljicama (296,297,298). U posteljici štakora ciklin D1 i ciklin D3 izraženi su u stanicama fetalnog dijela posteljice (299). U ljudskoj posteljici nađeni su u stanicama endotela (300). Jedan rad pokazao je porast ciklina D3 u resicama i bazalnoj ploči

dijabetičnih posteljica u usporedbi sa zdravima (301). Moguće je da njegova pojačana ekspresija doprinosi većoj stopi stanične proliferacije u dijabetičkim posteljicama. Ciklini D aktiviraju se TCF/LEF sustavom i povezuju izvanstanične signale s mehanizmima staničnog ciklusa (302).

U našem radu nismo našli statistički značajnu razliku u masi posteljica kao niti u fetoplacentnom omjeru između kontrolnih i ispitivanih skupina kompliciranih gestacijskim dijabetesom. Pojačana izraženost TCF1 u trudnoćama kompliciranim gestacijskim dijabetesom koju smo izmjerili u našim uzorcima sukladna je s rezultatima radova koji opisuju pojačanu proliferaciju stanica trofoblasta u trudnica s dijabetesom. (297-301)

U ispitanim uzorcima nismo našli očekivano smanjenje izraženosti TCF u posteljicama iz ostalih patoloških trudnoća osim u terminskom idiopatskom IUGRu odnosu na prijevremene kontrole. Smanjenu izraženost transkripcijskih faktora potrebnih za prepisivanje gena zaduženih za invazivnost i migraciju trofoblasta pripisali bismo stoga, u skladu s ranije navedenim radovima (297-301), slabijoj proliferaciji stanica trofoblasta u posteljicama sa zastojem u rastu (što se očituje u manjoj masi posteljice u našoj ispitivanoj skupini) prije nego li neuspješnoj EMT.

Povezanost TCF i dijabetesa ogleda se i u povezanosti lokusa *TCF7* (drugo ime za TCF1) s genetskom predispozicijom za razvoj dijabetesa tipa 1. Povezanost alela *TCF7A* s ranim početkom bolesti ukazuje na mogućnost da proizvod tog alela ranije pokreće ili ubrzava autoimuni proces povezan s tom bolesti, moguće putem pojačavanja ekspresije citokina Th1 (303).

Meta analizom je nađeno da su polimorfizmi 8 gena, među kojima je i *TCF7L2* (TCF4) povezani s gestacijskim dijabetesom (304). Gestacijski se dijabetes smatra multifaktorijalnom bolešću u kojoj se faktori okoline isprepliću s genetskom predispozicijom. Žene s gestacijskim dijabetesom imaju povećan rizik za razvoj dijabetesa tipa 2 kasnije u životu (305). Trudnice koje u obiteljskoj anamnezi imaju šećernu bolest, imaju povišen rizik za razvoj gestacijskog dijabetesa u trudnoći (306). Može se stoga pretpostaviti da gestacijski dijabetes ima iste rizične faktore i genetsku podlogu kao i dijabetes tipa 2, iako je do sada genetika gestacijskog dijabetesa slabo istražena (307, 308). Pojačana izraženost svih TCF/LEF faktora kao i GSK3 β , c-myc i ciklina D1 također je zapažena u dijabetesu tipa 2, osobito u beta stanicama gušterače u kojima c-myc pokreće apoptozu (309). Utjecaj ovih gena u posteljici žena s dijabetesom nije do sada zasebno ispitan, no nije nemoguće pretpostaviti sličan mehanizam djelovanja kojim bi se onda objasnila jača ekspresija TCF1 u

posteljicama trudnica s gestacijskim dijabetesom nego u posteljicama iz ostalih patoloških trudnoća.

6.3. ELF5

Za postizanje optimalne prokrvljenosti posteljice potrebna je uspješna pretvorba spiralnih arterija invazijom ekstraviloznog trofoblasta, koji je, da bi mogao obaviti tu zadaću morao poprimiti karakteristike mezenhimnih stanica, odnosno proći epitelno-mezenhimnu tranziciju. Tijekom EMT stanice ekstraviloznog trofoblasta smanjuju proliferaciju, postaju pokretne i invadiraju endometrij i spiralne arterije u miometriju (61, 310).

Transkripcijski faktor SNAIL smatra se ključnim regulatorom EMT (311,312). Dokazana je uloga proteina SNAIL u progresiji humanih tumora smanjivanjem transkripcije E kadherina vezivanjem na njegov promotor (311, 313,314). SNAIL pokreće EMT omogućujući stanicama pokretljivost i invazivnost (208,209). Transkripcijski faktor SNAIL je pod kontrolom više signalnih puteva (69) i faktora, uključujući i ELF5 (210, 211) . Transkripcijski faktor ELF5 zaustavlja EMT direktnim sprečavanjem transkripcije proteina SNAIL (179). Represijom proteina SNAIL, ELF5 može preusmjeriti tranziciju u obrnutom, dakle MET smjeru te tako održati epitelni fenotip ciljnih stanica, odnosno održati adheziju a onemogućiti migraciju i invaziju (179).

Očekivali smo stoga pojačanu izraženost ELF5 u posteljicama u kojima EMT nije bila uspješna ili nije dovoljno dugo trajala.

Imunohistokemijskim i imunofluorescentnim bojanjem ELF5 pozitivne stanice pronašli smo u viloznom citotrofoblastu te u EVT. U našim je uzorcima ekspresija ELF 5 nađena u citoplazmi EVT stanica u decidui i stanica trofoblasta korionskih resica posteljice.

Imunohistokemijsko bojanje naših uzoraka pokazalo je pojačanu ekspresiju ELF5 u citoplazmi stanica ekstraviloznog trofoblasta u decidui kao i u korionskim resicama

terminskih posteljica s idiopatskim zastojem u rastu, te prijevremeno porođenih posteljica sa zastojem uz povišeni tlak majke kao i s povišenim tlakom uz eutrofičnu djecu.. Također je isti nalaz evidentiran i u prijevremenim posteljicama pacijentica čije su trudnoće komplicirane istovremeno povišenim tlakom i gestacijskim dijabetesom.

Ekspresija proteina ELF5 bila je statistički značajno manja u posteljicama kod prijevremenog poroda u usporedbi s kontrolnim terminskim posteljicama. To bi moglo značiti povišenu razinu proteina SNAIL, te još uvijek aktivnu EMT.

Budući da je ELF5 marker epitelnog fenotipa stanica, odnosno inhibitor EMT, njegova pojačana izraženost u patološkim trudnoćama ukazuje na poremećenu EMT u bolestima trudnoće.

Naši podaci pokazuju da je u preeklamptičnim posteljicama pojačana ekspresija ELF 5 (koji je represor proteina SNAIL, te povišenje ELF 5 rezultira smanjenjem ekspresije SNAIL i posljedičnim povećanjem ekspresije E kadherina). Naši su rezultati u suglasnosti s ranijim radovima koji posredno, analizirajući izraženost proteina SNAIL (koji je pod kontrolom ELF5) ukazuju na poremećaj EMT u hipertenzivnim poremećajima u trudnoći. Budući da ELF5 sprječava transkripciju proteina SNAIL, porast ekspresije ELF5 odgovarao bi manjoj izraženosti SNAIL proteina u navedenim radovima.

Rad Fedorove iz 2012. godine (200) pokazao je redukciju SNAIL proteina u preeklamptičnim posteljicama što je u suglasju s našim rezultatima. Fedorova i suradnici su određivali razinu SNAIL2 i E- kadherina u preeklamptičnim posteljicama (200). U tom je radu imunohistokemijski prikazano SNAIL pozitivno bojenje u jezgrama viloznog trofoblasta i mezenhimnih stanica ali i u invazivnom trofoblastu u decidui. U radu Fedorove, u posteljicama s preeklampsijom, razina transkripcijskog faktora SNAIL bila je znatno smanjena u ekstraktima totalne placente (200).

Raniji rad Blechschmidt i suradnika iz 2007. godine (180) opisuje povišenje SNAIL pozitivnih stanica EVT u bazalnoj ploči posteljice u preeklamptičnim i HELLP posteljicama u odnosu na posteljice iz normalnih trudnoća. Fedorova je objasnila tu razliku osjetljivošću ekspresije SNAIL proteina na hipoksiju i oksidativni stres (200). Logično je pretpostaviti postojanje hipoksije koja povisuje SNAIL u posteljici zbog neadekvatne pretvorbe spiralnih arterija bilo direktno aktivacijom promotora pomoću HIF-1 α ili pomoću medijatora hipoksičnih signala poput EGF, TGF α , TNF α (209). Porast SNAIL proteina pomoću HIF 1 α dokazan je u kulturama stanica viloznog trofoblasta prvog tromjesečja, čime se smanjuje E kadherin i aktivira EMT u tom razvojnem razdoblju (315). Mezenhimne stanice resica

potiču od ekstraembrionalnog mezoderma koji se formira tijekom primarne EMT u ranom razdoblju embrionalnog razvoja. Shodno tome, mezenhimne stanice mogu zadržati ekspresiju SNAIL proteina iz tog razdoblja (200).

Oksidativni stres pokreće transkripciju SNAIL (209, 316) a hipoksija inhibira njegovu razgradnju u proteosomima. Budući da je za preeklampsične posteljice karakterističan pojačani oksidativni stres, pojačana ekspresija HIF 1 α i 2 α (317) i smanjena aktivnost proteosoma (318) mogao bi se pretpostaviti porast aktivnosti SNAIL proteina u tim posteljicama, kao što je opisala Blechschmidt.

Međutim, u radu Blechschmidtove skupine posteljica dobivene iz trudnoća kompliciranih preeklampsijom prosječne su gestacijske dobi 33,18 tjedana, a one iz trudnoća s HELLPom 33,8 tjedana, dakle obje skupine su prijevremeno porođene. Za razliku od toga, kontrolna skupina posteljica porođena je u prosječnoj gestacijskoj dobi 38,2 tjedna, dakle u terminu. Na osnovi naših rezultata, možemo zaključiti da je povišena razina proteina SNAIL u patološkim posteljicama u radu Blechschmidt i suradnika posljedica razlike u gestacijskoj dobi između ispitivanih i kontrolne skupine, a ne same ispitivane patologije. Na ovom primjeru uočava se važnost ispravnog formiranja ispitivanih skupina prema gestacijskoj dobi ukoliko se analiziraju zbivanja u placenti. Razina ELF5 u prijevremenim je posteljicama statistički značajno niža nego u terminskim posteljicama (dakle očekujemo da je SNAIL povišen). Prijevremeno porođene posteljice s dodatnom patologijom (IUGR, povišeni tlak majke, gestacijski dijabetes) imaju također manju ekspresiju ELF 5 (dakle višu razinu SNAIL proteina) u odnosu na terminsku kontrolnu skupinu, ali veću u odnosu na kontrolnu skupinu prijevremeno porođenih posteljica. Terminske posteljice sa zastojem u rastu ploda također pokazuju pojačanu izraženost ELF5 u odnosu na terminske kontrole.

Rad Fedorove, koja je ispravno usporedila terminsku patologiju s terminskom kontrolnom skupinom, te zasebno formirala kontrolnu skupinu prijevremenih poroda kao što smo učinili i mi, pokazuje da drugi faktori imaju veći učinak na SNAIL od oksidativnog stresa i hipoksije, te tako utječu na razvoj posteljice. Zaista, poremećaj oksigenacije u posteljicama s preeklampsijom sekundaran je u odnosu na primarni uzrok – placentnu insuficijenciju zbog defektne funkcije trofoblasta (201, 204, 319). Fedorova i suradnici dokazali su da je u preeklampsičnim posteljicama razina SNAIL proteina smanjena oko 30 % u usporedbi s normalnim posteljicama (200). Toliko bi bilo očekivano povišenje ELF5 u patološkim posteljicama, što se pokazalo i u našim rezultatima.

Snížena razina SNAIL može potaknuti promjene u različitim putevima diferencijacije placentalnih staničnih linija i tako doprinijeti razvoju preeklampsije i IUGR.

Morfološki se preeklamptične posteljice razlikuju od normalnih zbog poremećenog grananja viloznog stabla, osobito kad je preeklampsija kombinirana sa zastojem u rastu (202). Znači da bi smanjena ekspresija SNAIL-a pomoću ELF5 ili drugim načinom doprinijela razvoju preeklampsije promjenama u početnom stadiju razvoja posteljice, jer se smatra da SNAIL ima ulogu u angiogenezi.

U prijevremenim posteljicama bez pridružene patologije u našem radu ekspresija ELF 5 je statistički značajno manja u odnosu na terminske kontrole i na prijevremeno porođene patološke posteljice. Prema Fedorovoj, u prijevremeno porođenim posteljicama razina proteina SNAIL varira ali u njezinom radu postoji trend prema statističkoj sličnosti između prijevremenih i preeklamptičnih posteljica (200). Fedorova je u spomenutom radu ukazala i na sličnu ekspresiju E-kadherina u preeklamptičnim i prijevremeno porođenim posteljicama.

Mi smo takve rezultate dobili uspoređujući ekspresiju SPRP1 i SFRP3 u patološkim i prijevremeno porođenim posteljicama, no ne i u slučaju ELF5.

Povišena razina ELF 5 u prijevremeno porođenim patološkim posteljicama u odnosu na “kontrolne” prijevremene posteljice ukazuje na neadekvatnu EMT kao na uzrok slabije invazije trofoblasta koja vodi u patološku trudnoću.

Budući da postoji i statistički značajna razlika između prijevremene patologije i terminskih kontrola, moguće je da se već od početka invazije jače izlučuju inhibitori EMT, što samo postaje evidentno u kasnijim stadijima trudnoće.

Pokazali smo da su povišen tlak i zastoj u rastu povezani sa statistički značajno povišenom razinom ELF5 proteina u posteljicama iz trudnoća s navedenom patologijom. U suglasju s podacima iz literature, ovaj rad ukazuje na poremećaj EMT u različitim patološkim stanjima u trudnoći.

Naši rezultati stoga podcrtavaju značaj neadekvatne diferencijacije trofoblasta kao mogućeg uzroka patoloških stanja u trudnoći.

7. ZAKLJUČCI

Analizom ekspresije inhibitora i aktivatora Wnt signalnog puta kao i neovisnog biljega epitelnog fenotipa, proteina ELF5, došli smo do slijedećih zaključaka:

1. Ekspresija SFRP1 i SFRP3 statistički je značajno veća u prijevremeno porođenim posteljicama bez pridružene patologije nego u terminskim posteljicama iz normalnih trudnoća.
2. Ekspresija SFRP1 i SFRP3 statistički je značajno veća u patološkim terminskim i patološkim prijevremenim posteljicama u odnosu na terminsku kontrolnu skupinu.
3. Ukupna ekspresija SFRP1 i SFRP3, kao i zasebna ekspresija u decidui svih terminskih patoloških skupina, statistički se ne razlikuje od ekspresije u prijevremeno porođenim posteljicama bez pridružene patologije.
4. Ukupna ekspresija SFRP1 i SFRP3, kao i zasebna ekspresija u korionskim resicama prijevremeno porođenih posteljica iz trudnoća kompliciranih gestacijskim dijabetesom, manja je nego u kontrolnoj skupini posteljica.
5. U korionskim resicama prijevremeno porođenih patoloških posteljica našli smo smanjenu izraženost SFRP3 proteina u odnosu na resice kontrolne skupine prijevremenih poroda.
6. Jaća izraženost TCF1 u odnosu na terminsku kontrolu nađena je samo u prijevremeno porođenim posteljicama iz trudnoća kompliciranih gestacijskim dijabetesom (bez obzira je li krvni tlak majke povišen ili normalan).
7. Najslabija ekspresija TCF1 nađena je u terminskom IUGR uz povišeni tlak majke.
8. Ekspresija ELF 5 nađena je u citoplazmi u viloznom citotrofoblastu te u ekstraviloznom trofoblastu u decidui.
9. Ekspresija proteina ELF5 bila je statistički značajno manja u kontrolnim posteljicama iz prijevremenih poroda u usporedbi s kontrolnim terminskim posteljicama.
10. Značajno veća ekspresija ELF5 zapažena je u terminskim i prijevremenim posteljicama iz trudnoća s IUGR te u prijevremenim posteljicama s hipertenzivnim poremećajem u odnosu na odgovarajuće kontrolne posteljice.

8. SAŽETAK

Diferencijacija stanica trofoblasta u normalnoj i patološkoj trudnoći

Jasenska Zmijanac Partl, disertacija, 2016.

Diferencijacija trofoblasta je proces koji uključuje epitelno - mezenhimsku tranziciju (EMT) u kojoj ključnu ulogu igraju akteri signalnog puta Wnt. SFRP1 i SFRP3 su antagonisti Wnt signalnog puta koji nastoje održati epitelne karakteristike stanica dok je protein TCF1 zadužen za invaziju stanica trofoblasta.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati izraženost antagonista signalnog puta Wnt, proteina SFRP1 i SFRP3, u zdravim i patološkim posteljicama (IUGR, hipertenzivni poremećaji, gestacijski dijabetes) kao i izraženost pozitivnog regulatora istog signalnog puta, proteina TCF1. Odabirom nezavisnog biljega epitelnog fenotipa, proteina ELF5, dodatno se potvrdio dobiveni rezultat.

Imunohistokemijskim metodama dobili smo jaču izraženost SFRP1 i SFRP3 u normalnim prijevremenim nego u terminskim posteljicama. Ukupna razina SFRP1 i SFRP3 antigena bila je povišena u posteljicama svih patoloških skupina u odnosu na terminske kontrole. Zanimljivo je, da nije bilo statistički značajne razlike između normalnih prijevremenih i terminskih IUGR i preeklampsičnih posteljica. U korionskim resicama posteljica iz trudnoća kompliciranih gestacijskim dijabetesom izraženost SFRP1 i SFRP3 bila je manja, dok je ukupna razina TCF1 bila povišena, što ukazuje na izraženiju proliferaciju trofoblasta. Niža razina proteina SFRP3 nađena je i u korionskim resicama prijevremenih patoloških posteljica u odnosu na zdrave dok mu je izraženost u decidui poput SFRP1. Ovakvi nalazi ukazuju na moguću ulogu SFRP3 u poticanju staničnog rasta u normalnom tkivu resica, odnosno na dvostruku ulogu SFRP3 tijekom placentacije.

Ekspresija ELF5 manja je u zdravim prijevremenim nego u terminskim posteljicama što ukazuje na aktivnu EMT. U patološkim prijevremenim i terminskim posteljicama razina ELF5 značajno je veća u usporedbi s odgovarajućim kontrolama. Ovi nalazi potvrđuju ulogu ELF5 u supresiji EMT u patološkim trudnoćama.

Naši nalazi podupiru teoriju prema kojoj Wnt ima dinamičnu ulogu u patogenezi IUGR, hipertenzivnih poremećaja i gestacijskog dijabetesa. Također smo utvrdili povezanost ELF5 s poremećajima trudnoće povezanim s neadekvatnom invazijom i diferencijacijom trofoblasta. Možemo zaključiti da poremećaj regulacije mreže signalnih puteva narušava homeostazu u posteljičnom tkivu i vodi do različitih bolesti vezanih uz trudnoću.

9. SUMMARY

Differentiation of Human Trophoblast Cells in Normal and Pathological Pregnancy

Jasenska Zmijanac Partl, Ph. D. Thesis, 2016.

Differentiation of trophoblast cells is a process that involves an epithelial-mesenchymal transition (EMT) in which components of the Wnt signaling pathways play a crucial role. SFRP1 and SFRP3 act as Wnt antagonists, tending to maintain the characteristics of epithelial cells while TCF1 is implicated in trophoblast cell invasion.

The aim of this study was to analyse the expression of Wnt signaling pathway antagonists, SFRP1 and SFRP3 proteins, and its positive regulator TCF1 in normal and pathological placentas (IUGR, hypertensive disorders, gestational diabetes). An independent marker of epithelial phenotype ELF5, was chosen to additionally confirm our findings.

Immunohistochemical analysis demonstrated elevated levels of SFRP1 and SFRP3 in normal preterm compared to term placentas. Total levels of SFRP1 and SFRP3 proteins were also increased in all groups of pathological placentas compared to term controls. Interestingly, there was no statistical difference between normal preterm and term IUGR and preeclamptic placentas. Placentas from pregnancies complicated by gestational diabetes showed lower expression of SFRP1 and SFRP3 in chorionic villi and higher total levels of TCF1, demonstrating a more expressed trophoblastic proliferation.

Lower levels of SFRP3 were also found in chorionic villi of preterm pathological placentas compared to healthy placentas, while its expression in decidual tissue was similar to SFRP1. These findings suggest the involvement of SFRP3 in cell growth promotion of normal villous tissue and indicate that SFRP3 may play a dual role during placentation.

ELF5 expression was lower in healthy preterm than in term placentas, indicating active EMT. Pathological preterm and term placentas showed significantly higher ELF5 levels compared to control groups. These findings establish ELF5 as a suppressor of EMT in pathological pregnancies.

Our data support the theory in which Wnt pathway has a dynamic role in the pathogenesis of IUGR, hypertensive disorders and gestational diabetes. We also found significant association of ELF5 with pregnancy disorders which have been related to the regulation of trophoblastic invasion and differentiation. We can conclude that impaired regulation of the Wnt signalling pathways can disrupt tissue homeostasis and lead to different pregnancy-related diseases.

10. POPIS LITERATURE

1. Rai A, Cross JC. Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. *Developmental Biology* 2014;387:131-41
2. Watson ED, Cross JC. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology*, 2005; 20:180-93
3. Wooding FBP, Flint APF. Placentation. U: Lamming GE, (Ed). *Marshall's Physiology of reproduction*, 4. izd. New York: Chapman and Hall; 1994, str. 233-460
4. Zhou Y, Genbacev O, Fisher SJ. The human placenta remodels the uterus by using a combination of molecules that govern vasculogenesis or leukocyte extravasation. *Ann NY Acad Sci* 2003; 995:73-83
5. Serman A, Serman L. Development of placenta in a rodent-model for human placentation. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011;3:233-39.

6. Vlahović M, Bulić-Jakuš F, Jurić-Lekić G, Fučić A, Marić S, Šerman D. Changes in placenta and developing rat embryo caused by a demethylating agent 5-azacytidine. *Int J Dev Biol* 1999;43:843-6.
7. Serman L, Vlahovic M, Sijan M, i sur. The impact of 5-azacytidine on placental weight , glycoprotein pattern and proliferating cell nuclear antigen expression in rat placenta. *Placenta* 2007; 28:803-11.
8. Šerman Lj, Šijan M, Kuzmić R, i sur. Expressionsveränderungen von membranproteinen in mit 5-azacytidin behandelten rattenplazentas. *Tierärztliche Umschau* 2008; 63:391-5.
9. Serman L, Nikuseva Martić T, Serman A, Vranic S. Epigenetic alterations of the Wnt signaling pathway in cancer: a mini review. *Bosn J Basic Med Sci* 2014;14(4):191-4.
10. Hemberger M, Hughes M, Cross JC. Trophoblast stem cells differentiate in vitro into invasive trophoblast giant cells. *Dev Biol* 2004;271(2):362-71.
11. Serman L, Serman A, Fabijanovic D. An in vivo rat model to study epigenetic control of cell invasion. *Med Hypotheses* 2011;6:407-9.
12. Sonderegger S, Pollheimer J, Knöfler M. Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation - review. *Placenta* 2010;31:839-47.
13. Perry JK, Lins RJ, Lobie PE, Mitchell MD. Regulation of invasive growth: similar epigenetic mechanisms underpin tumour progression and implantation in human pregnancy. *Clin Sci* 2009;118:451-7.
14. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119:1420-8.
15. Rahnema F, Shafiei F, Gluckman PD, Mitchell MD, Lobie PE. Epigenetic regulation of human trophoblastic cell migration and invasion. *Endocrinology* 2006;147:5275-83.
16. Rahnema F, Thompson B, Steiner M, Shafiei F, Lobie PE, Mitchell MD. Epigenetic regulation of E-cadherin controls endometrial receptivity. *Endocrinology* 2009;150:1466-72
17. Pecina-Slaus N, Cicvara-Pecina T, Kafka A. Epithelial-to-mesenchymal transition: possible role in meningiomas. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012;4:889-96.
18. Pollheimer J, Loregger T, Sonderegger S, i sur. Activation of the canonical wingless/T-cell factor signaling pathway promotes invasive differentiation of human trophoblast. *Am J Pathol* 2006;168:1134-47.
19. Ekström EJ, Sherwood V, Andersson T. Methylation and loss of Secreted Frizzled-Related Protein 3 enhances melanoma cell migration and invasion. *PLOS One* 2011;6:18674.
20. Peng S, Li J, Miao C i sur. Dickkopf-1 secreted by decidual cells promotes trophoblast cell invasion during murine placentation. *Reproduction* 2008;135: 367-75.
21. Kongkham PN, Northcott PA, Croul SE, Smith CA, Taylor MD, Rutka JT. The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. *Oncogene* 2010;29:3017-24.
22. Cheng CW, Smith SK, Charnock-Jones DS. Transcript profile and localization of Wnt signaling-related molecules in human endometrium. *Fertil Steril* 2008;90:201-4.
23. Bai Q, Assou S, Haouzi D, i sur. Dissecting the first transcriptional divergence during human embryonic development. *Stem Cell Rev* 2012;8 (1):150-62.

24. Ralston A, Rossant J. Cdx2 acts downstream of cell polarisation to cell-autonomously promote trophoectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev Biol* 2008;313:614-29
25. Roode M, Blair K, Snell P, i sur. Human hypoblast formation is not dependent on FGF signalling. *Dev Biol* 2012;361(2):358-63.
26. Kim PT, Ong CJ. Differentiation of definitive endoderm from mouse embryonic stem cells. *Results Probl Cell Differ* 2012;55:303-19.
27. Hemberger M, Dean W, Reik W. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:526-37
28. Ng RK, Dean W, Dawson C i sur. Epigenetic restriction of embryonic cell lineage fate by methylation of Elf5. *Nat Cell Biol* 2008;10:1280-90
29. Mathsyaraja H, Ostrowski MC. Setting Snail2's pace during EMT. *Nat Cell Biol* 2012;14:1122-3.
30. Hemberger M, Udayashankar R, Tesar P, Moore H, Burton GJ. ELF5-enforced transcriptional networks define an epigenetically regulated trophoblast stem cell compartment in the human placenta. *Hum Mol Genet* 2010;19:2456-67.
31. Bischof P, Irminger-Finger I. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1-16
32. Strauss JF III, Barbieri RL, ur. Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology. 5. izd. Philadelphia: Elsevier; 2004
33. Kos M, Leniček T. Osnove patologije posteljice. Zagreb: Medicinska naklada; 2011
34. Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 1992;80:283-5
35. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Med* 2003;9:653-60
36. Khong TY. The placenta and umbilical cord. U: Fetal and neonatal pathology. Keeling JW ur. London-Berlin: Springer; 2001
37. Lyall F, Bulmer JN, Kelly H, Duffie E, Robson SC. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of nitric oxide. *Am J Pathol* 1999;154:1105-14
38. Cross JC, Hemberger M, Lu Y i sur. Trophoblast functions, angiogenesis and remodelling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187:207-12
39. Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genetics* 2001;2:538-48
40. Harris LK. Review: trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. *Placenta*, 2010; 31 (Suppl): 593-8
41. Armant DR, Kameda S. Mouse trophoblast cell invasion of extracellular matrix purified from endometrial tissue: a model for peri-implantation development. *J Exp Zool* 1994; 269:146-56
42. Lei T, Hohn HP, Behr R, Denker HW. Influences of extracellular matrix and of conditioned media on differentiation and invasiveness of trophoblast stem cells. *Placenta* 2007; 28:14-21

43. Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* 1983; 4:397-413
44. Hazan AD, Smith SD, Jones RL, Whittle W, Lye SJ, Dunk CE. Vascular leukocyte interactions: mechanisms of human decidual spiral artery remodelling in vitro. *Am J Pathol* 2010;177:1017-30
45. Robson A, Harris LK, Innes BA i sur. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodelling in human pregnancy. *FASEB J: Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2012; 26: 4876-85
46. Bentin-Ley U, Lopata A. In vitro models of human blastocyst implantation. *Bailliere's Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000;14:765 - 74.
47. Chakraborty D, Rumi MA, Konno T, Soares MJ. Natural killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2011;108:16295-300
48. Whitley GS, Cartwright JE. Trophoblast-mediated spiral artery remodelling: a role for apoptosis. *J Anat* 2009;215:21-6
49. Ashton SV, Whitley GS, Dash PR i sur. Uterine spiral artery remodelling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:102-8
50. Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. *Placenta* 2007;28 (Suppl A):64-9
51. Benirschke, K. The Placenta: Structure and Function. *NeoReviews* 2004; 5:252 - 61.
52. Tran CH, Welsh DG. Current perspective on differential communication in small resistance arteries. *Can J Physiol Pharmacol* 2009;87:21-8
53. Welsh DG, Taylor MS. Cell-cell communication in the resistance vasculature: the past, present and future. *Microcirculation* 2012;19:377-8
54. Kaufmann P, Sen DK, Schweikhart G. Classification of human placental villi. I. Histology and scanning electron microscopy. *Cell Tissue Res* 1979; 200:409-23
55. Forbes K, Westwood M, Baker PN, Aplin JD. Insulin-like growth factor I and II regulate the life cycle of trophoblast in the developing human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294:C1313-22
56. Prakobphol A, Genbacev O, Gormley M, Kapidzic M, Fisher SJ. A role for the L-selectin adhesion system in mediating cytotrophoblast emigration from the placenta. *Dev Biol* 2006;298:107-17
57. Van Dijk M, Oudejans CB. STOX1: key player in trophoblast dysfunction underlying early onset preeclampsia with growth retardation. *J Pregnancy* 2011; 2011: 521826 doi: 10.1155/2011/521826
58. Biadasiewicz K, Sonderegger S, Haslinger P i sur. Transcription factor AP-2alpha promotes EGF-dependent invasion of human trophoblast. *Endocrinology* 2011; 152:1458-69

59. Loregger T, Pollheimer J, Knöfler M. Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast – a review. *Placenta* 2003; 24 (Suppl A):104-10
60. Knöfler M, Pollheimer J. IFPA award in placentology lecture: molecular regulation of human trophoblast invasion. *Placenta* 2012; 33 (Suppl.): 55-62
61. Damsky CH, Librach C, Lim KH i sur. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 1994;120: 3657-66
62. Aplin JD, Haigh T, Jones CJ, Church HJ, Vicovac I. Development of cytotrophoblast columns from explanted first-trimester human placental villi: role of fibronectin and integrin alpha5beta1. *Biol Reprod* 1999; 60:828-38
63. Janatpour MJ, McMaster MT, Genbacev O i sur. Id-2 regulates critical aspects of human cytotrophoblast differentiation invasion and migration. *Development* 2000; 127:549-58
64. Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ. Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J. Clin. Invest.* 1999; 103:1641-50
65. Caniggia I, Mostachfi H, Winter J i sur. Hypoxia- inducible factor -1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J Clin Invest* 2000;105:577-87
66. Lim KH, Zhou Y, Janatpour M i sur. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am J Pathol* 1997;151:1809-18
67. Bischof P, Meisser A, Campana A. Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion – a review. *Placenta* 2000; 21 (Suppl A):55-60
68. Lala PK, Chakraborty C. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to preeclampsia and fetal injury. *Placenta* 2003; 24;575-87
69. Knöfler M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol* 2010;54: 269-80
70. Lala PK, Graham CH. Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and protease inhibitors. *Cancer Metastasis Rev* 1990;9:369-79
71. Haider S, Knöfler M. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta* 2009;30:111-23
72. Nadeem L, Munir S, Fu G i sur. Nodal signals through activin receptor –like kinase 7 to inhibit trophoblast migration and invasion: implication in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Pathol* 2011;178:1177-89
73. Bilban M, Tauber S, Haslinger P i sur. Trophoblast invasion: assessment of cellular models using gene expression signatures. *Placenta* 2010;31: 989-96
74. Apps R, Murphy SP, Fernando R, Gardner L, Ahad T, Moffett A. Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines,

- determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. *Immunology* 2009;127:26-39
75. Pollheimer J, Knöfler M. Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review. *Placenta* 2005;26 (Suppl A):21-30
 76. Yagi R, Kohn MJ, Karavanova I i sur. Transcription factor TEAD4 specifies the trophoectoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* 2007;134(21):3827-36
 77. Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y i sur. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 2005;132:2093-102
 78. Home P, Ray S, Dutta D, Bronshteyn I, Larson M, Paul S. GATA3 is selectively expressed in the trophoectoderm of peri-implantation embryo and directly regulates Cdx2 gene expression. *J Biol Chem* 2009;284:28729-37
 79. Ray S, Dutta D, Rumi MA, Kent LN, Soares MJ, Paul S. Context-dependent function of regulatory elements and switch in chromatin occupancy between GATA3 and GATA2 regulate Gata2 transcription during trophoblast differentiation. *J Biol Chem* 2009;284:4978-88
 80. Russ AP, Wattler S, Colledge WH i sur. Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* 2000;404:95-9
 81. Donnison M, Beaton A, Davey HW, Broadhurst R, L'Huillier P, Pfeffer PL. Loss of the extraembryonic ectoderm in Elf5 mutants leads to defects in embryonic patterning. *Development* 2005;132:2299-308
 82. Auman HJ, Nottoli T, Lakiza O, Winger Q, Donaldson S, Williams T. Transcription factor AP-2gamma is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development. *Development* 2002;129:2733-47
 83. Wen F, Tynan JA, Cecena G i sur. Ets2 is required for trophoblast stem cell self-renewal. *Dev Biol* 2007;312:284-99
 84. Luo J, Sladek R, Bader J-A, Matthysen A, Rossant J, Giguere V. Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-b. *Nature* 1997; 388:778-82
 85. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D i sur. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoectoderm differentiation. *Cell* 2005;123:917-29
 86. Dietrich JE, Hiiragi T. Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development* 2007;134:4219-31
 87. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 2002; 241:172-82
 88. Chapman V, Forrester L, Sanford J, Hastie N, Rossant J. Cell lineage-specific undermethylation of mouse repetitive DNA. *Nature* 1984; 307:284-6

89. Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M i sur. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol* 2003;13:1116-21
90. Prudhomme S, Bonnaud B, Mallet F. Endogenous retroviruses and animal reproduction. *Cytogenet Genome Res* 2005;110:353-64
91. Frendo JL, Olivier D, Cheynet V i sur. Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol* 2003; 23:3566-74
92. Gimenez J, Montgiraus C, Oriol G i sur. Comparative methylation of ERVWE1/syncytin-1 and other human endogenous retrovirus LTRs in placenta tissues. *DNA Res* 2009;16:195-211
93. Matouskova M, Blazkova J, Pajer P, Pavlicek A, Hejnar J. CpG methylation suppresses transcriptional activity of human syncytin-1 in non-placental tissues. *Exp Cell Res* 2006; 312:1011-20
94. Apps R, Sharkey A, Gardner L i sur. Genome-wide expression profile of first trimester villous and extravillous human trophoblast cells. *Placenta* 2011;32:33-43
95. Bilban M, Haslinger P, Prast J i sur. Identification of novel trophoblast invasion related genes: heme oxygenase-1 controls motility via peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Endocrinology* 2009;150:1000-13
96. Roose J, Clevers H. TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1999;1424:23-37
97. Logan CY, Nusse R. The Wnt signalling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810
98. Herr P, Hausmann G, Basler K. WNT secretion and signalling in human disease. *Trends Mol Med* 2012;18:483-93
99. Polakis P. Wnt signalling and cancer. *Genes Dev* 2000;14: 1837-51
100. Al-Harhi I. Wnt /beta-catenin and its diverse physiological cell signalling pathways in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. *J Neuroimmune Pharmacol* 2012; 7:725-30
101. Miller JR. The Wnts. *Genome Biol* 2002;3(1):3001.1-3001.15
102. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signalling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997;11:3286-305
103. Nusse R, Brown A, Papkoff J i sur. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell* 1991;64(2): 231
104. Bhanot P, Brink M, Samos CH i sur. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 1996;382:225-30
105. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signalling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:59-88
106. Hülsken J, Birchmeier W, Behrens J. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 1994;127:2061-9.

107. Peifer M, Pai LM, Casey M. Phosphorylation of the *Drosophila* adherens junction protein Armadillo: roles for wingless signal and zeste-white 3 kinase. *Dev Biol* 1994;166(2):543-56.
108. Hülsken J, Behrens J, Birchmeier W. Tumor-suppressor gene products in cell contacts: the cadherin-APC-armadillo connection. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6(5):711-6.
109. von Kries JP, Winbeck G, Asbrand C i sur. Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC. *Nat Struct Biol* 2000;7(9):800-7.
110. Willert K, Shibamoto S, Nusse R. Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex. *Genes Dev* 1999;15:1768-73.
111. Staal FJ, Noort MV, Strous GJ, Clevers HC. Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated beta-catenin. *EMBO Rep* 2002;3(1):63-8.
112. Lustig B, Behrens J. The Wnt signalling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:199-221
113. Amit S, Hatzubai A, Birman Y i sur. Axin – mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt Pathway. *Genes Dev* 2002; 16:1066-76
114. Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B i sur. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991;251:1366-70.
115. Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M i sur. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 1998;280: 596-99
116. Korinek V, Barker N, Morin PJ i sur. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 1997;275:1784-7.
117. Kielman MF, Rindapä M, Gaspar C i sur. Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signalling. *Nat Genet* 2002; 32(4):594-605
118. Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. Axin, a negative regulator of the Wnt signalling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J* 1998;17(5):1371-8
119. Wharton KA Jr. Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev Biol* 2003;253(1):1-17.
120. Sun TQ, Lu B, Feng JJ i sur. PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling. *Nat Cell Biol* 2001;3(7):628-36.
121. van Noort M, Clevers H. TCF transcription factors, mediators of Wnt-signalling in development and cancer. *Dev Biol* 2002;244(1):1-8.
122. Giese K, Kingsley C, Kirshner JR, Grosschedl R. Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev* 1995;9(8):995-1008.
123. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M i sur. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996;382:638-42

124. Hsu SC, Galceran J, Grosschedl R. Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signalling and association with beta-catenin. *Mol Cell Biol* 1998;18(8):4807-18.
125. Gordon MD, Nusse R. Wnt signalling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 2006;281(32):22429-33.
126. Stamos JL, Weis W. The beta-catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(1): a007898 doi: 10.1101/cshperspect.a007898
127. Metcalfe C, Bienz M. Inhibition of GSK3 by Wnt signalling – two contrasting models. *J Cell Sci* 2011;124: 3537-44
128. Clevers H. Wnt/beta-catenin signalling in development and disease. *Cell* 2006; 127:469-80
129. Archbold HC, Yang YX, Chen L, Cadigan KM. How do they do what they do?: regulation of transcription by the Wnt/beta-catenin pathway. *Acta Physiol (Oxf.)* 2012; 204:74-109
130. Beildeck ME, Gelmann EP, Byers SW. Cross-regulation of signalling pathways : an example of nuclear hormone receptors and the canonical Wnt pathway. *Exp Cell Res* 2010; 316:1763-72
131. Hendricks M, Leyns L. Non-conventional Frizzled ligands and Wnt receptors. *Dev Growth Differ* 2008; 50:229-43
132. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 2008; 4:68-75
133. Wang Y. Wnt/planar cell polarity signalling: a new paradigm for cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2009; 8:2103-9
134. Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signalling: beta-catenin independent pathways. *Cell Calcium* 2005; 38:439-46
135. De A. Wnt/Ca⁺ signalling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2011; 43:745-56
136. Ishitani T, Ishitani S. Nemo-like kinase, a multifaceted cell signalling regulator. *Cell Signal* 2013; 25:190-7
137. Nishita M, Enomoto M, Yamagata K, Minami Y. Cell/tissue –tropic functions of Wnt5a signalling in normal and cancer cells. *Trends Cell Biol* 2010; 20; 346-54
138. Minami Y, Oishi I, Endo M, Nishita M. Ror-family receptor tyrosine kinases in noncanonical Wnt signalling: their implications in developmental morphogenesis and human diseases. *Dev Dyn* 2010; 239:1-15
139. Mohamed OA, Dufort D, Clarke H. Expression and estradiol regulation of Wnt genes in the mouse blastocyst identify a candidate pathway for embryo-maternal signalling at implantation. *Biol Reprod* 2004; 71:417-24
140. Harwood BN, Cross SK, Radford EE, Haac BE, De Vries WN. Members of the WNT signalling pathways are widely expressed in mouse ovaries, oocytes and cleavage stage embryos. *Dev Dyn* 2008; 237:1099-111
141. De Vries WN, Evsikov AV, Haac BE i sur. Maternal beta-catenin and E cadherin in mouse development. *Development* 2004;131:4435-45

142. Xie H, Tranguch S, Jia X i sur. Inactivation of nuclear Wnt-beta-catenin signalling limits blastocyst competency for implantation. *Development* 2008; 135:717-27
143. Denicol AC, Dobbs KB, Meclaeen KM, Carambula SF, Loureiro B, Hansen PJ. Canonical Wnt signalling regulates development of bovine embryos to the blastocyst stage. *Sci Rep* 2013; 3:1266 doi: 10.1038/srep01266
144. Chen Q, Zhang Y, Lu J i sur. Embryo-uterine cross-talk during implantation: the role of Wnt signalling. *Mol Hum Reprod* 2009;15:215-21
145. Mohamed OA, Jonnaert M, Labelle-Dumais C, Kuroda K, Clarke HJ, Dufort D. Uterine Wnt/beta-catenin signalling is required for implantation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2005; 102:8579-84
146. Chawengsaksophak K, De Graaf W, Rossant J, Dechamps J, Beck F. Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. *Prac Natl Acad Sci U.S.A.* 2004; 101:7641-45
147. He S, Pant D, Schiffmacher A, Meece A, Keefer CI. Lymphoid enhancer factor 1-mediated Wnt signalling promotes the initiation of trophoblast lineage differentiation in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 2008;26: 842-49
148. Cross JC, Nakano H, Natale DR, Simmons DG, Watson ED. Branching morphogenesis during development of placental villi. *Differentiation* 2006;74: 393-401
149. Aoki M, Mieda M, Ikeda T, Hamada Y, Nakamura H, Okamoto H. R-spondin3 is required for mouse placental development. *Dev Biol* 2007;301;218-26
150. Matura K, Jigami T, Taniue K i sur. Identification of a link between Wnt/beta-catenin signalling and the cell fusion pathway. *Nat Commun* 2011;2:548-51
151. Morrish DW, Dakour J, Li H. Functional regulation of human trophoblast differentiation . *J Reprod Immunol* 1998; 39:179-95
152. Sonderegger S, Husslein H, Leisser C, Knöfler M. Complex expression pattern of Wnt ligands and frizzled receptors in human placenta and its trophoblast subtypes. *Placenta* 2007;28 (Suppl A):97-102
153. Li Q, Kannan A, Das A i sur. WNT4 acts downstream of BMP2 and functions via beta-catenin signalling pathway to regulate human endometrial stromal cell differentiation. *Endocrinology* 2013;154:446-57
154. Hayashi K, Erikson DW, Tilford SA i sur. Wnt genes in the mouse uterus: potential regulation of implantation. *Biol Reprod* 2009; 80:989-1000
155. Parr BA, Cornish VA, Cybulsky MI, McMahon AP. Wnt7b regulates placental development in mice. *Dev Biol* 2001; 237:324-32
156. Wu QL, Zierold C, Ranheim EA. Dysregulation of Frizzled 6 is a critical component of B-cell leukemogenesis in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; 113:3031-39
157. Golan T, Yaniv A, Bafico A, Liu G, Gazit A. The human Frizzled 6 (HFz6) acts as negative regulator of the canonical Wnt/beta-catenin signalling cascade. *J Biol Chem* 2004; 279:14879-88

158. Grisaru-Granovsky S, Maoz M, Barzilay O, Yin YJ, Prus D, Bar-Shavit R. Protease activated receptor-1, PAR-1, promotes placental trophoblast invasion and beta-catenin stabilization. *J Cell Physiol* 2009;218:512-21
159. Hess AP, Hamilton AE, Talbi S i sur. Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol Reprod* 2007;76:102-17
160. Sonderegger S, Haslinger P, Sabri A i sur. Wingles (Wnt)-3A induces trophoblast migration and matrix metalloproteinase-2 secretion through canonical Wnt signalling and protein kinase B/AKT activation. *Endokrinology* 2010;151:211-20
161. Wu B, Crampton SP, Hughes CC. Wnt signalling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* 2007;26:227-39
162. Novakovic B, Rakyan V, Ng HK i sur. Specific tumour-associated methylation in normal human term placenta and first- trimester cytotrophoblasts. *Mol Hum Reprod* 2008;14:547-54
163. Wong NC, Novakovic B, Weinrich B i sur. Methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene in human placenta and hypermethylation in choriocarcinoma cells. *Cancer Lett* 2008;268:56-62
164. Yang Y, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 2008;14:818-29
165. Kokkinos MI, Murthi P, Wafai R, Thompson EW, Newgreen DF. Cadherins in the human placenta – epithelial-mesenchymal transition (EMT) and placental development. *Placenta* 2010;31:747-55
166. Garrod D, Chidgey M. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778:572-87
167. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 1995;154:8-20
168. Vincent-Salomon A, Thiery JP. Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development. *Breast Cancer Res* 2003;5:101-6
169. Jokhi PP, King A, Loke YW. Reciprocal expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and c-erbB2 by non-invasive and invasive human trophoblast populations. *Cytokine* 1994;6:433-42
170. Harris LK, McCormick J, Cartwright JE, Whitley GS, Dash PR. S-nitrosilation of proteins at the leading edge of migrating trophoblasts by inducible nitric oxide synthase promotes trophoblast invasion. *Exp Cell Res* 2008; 314:1765-76
171. Hunkapiller NM, Gasperowicz M, Kapidzic M i sur. A role for Notch signalling in the trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Development* 2011;138:2987-98
172. Zheng H, Kang Y. Multilayer control of the EMT master regulators. *Oncogene* 2014;33(14):1755-63.
173. Brabletz T. To differentiate or not- routes towards metastasis. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:425-36

174. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M i sur. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* 1997;99:2139-51
175. Moustaka A, Heldin CH. Signalling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 2007;98:1512-20
176. Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:827-37
177. Hollenhorst PC, McIntosh LP, Graves BJ. Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Ann Rev Biochem* 2011;80:437-71
178. Dittmer J, Nordheim A. Ets transcription factors and human disease. *Biochim Biophys Acta* 1998;1377:1-11
179. Chakrabarti R, Hwang J, Blanco MA i sur. Elf5 inhibits the epithelial-mesenchymal transition in mammary gland development and breast cancer metastasis by transcriptionally repressing Snail2. *Nat Cell Biol* 2012;14 (11):1212-22
180. Blechschmidt K, Mylonas I, Mayr D i sur. Expression of E-cadherin and its repressor Snail in placental tissue of normal, preeclamptic and HELLP pregnancies. *Virchows Arch* 2007;450:195-202
181. Peng S, Miao C, Li J, Fan X, Cao J, Duan E. Dickkopf-1 induced apoptosis in human placental choriocarcinoma is independent of canonical Wnt signalling. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;350:641-47
182. Kamino M, Kishida M, Kibe T i sur. Wnt-5a signalling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP-2. *Cancer Sci* 2011;102(3):540-8.
183. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28(1-2):151-66.
184. Huszar M, Pfeifer M, Schirmer U i sur. Up-regulation of L1CAM is linked to loss of hormone receptors and E-cadherin in aggressive subtypes of endometrial carcinomas. *J Pathol* 2010;220(5):551-61.
185. Zhang Z, Li H, Zhang L, Jia L, Wang P. Differential expression of beta-catenin and Dickkopf-1 in the third trimester placentas from normal and preeclamptic pregnancies: a comparative study. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;11:17 doi: 10.1186/1477-7827-11-17
186. Zhang Z, Zhang L, Jia L, Wang P, Gao Y. Association of Wnt2 and sFRP4 expression in the third trimester placenta in women with severe preeclampsia. *Reprod Sci* 2013;20: 981-89
187. Bao SH, Shuai W, Tong J, Wang L, Chen P, Duan T. Increased Dickkopf-1 expression in patients with unexplained recurrent spontaneous miscarriage. *Clin Exp Immunol* 2013;172:437-43
188. Angelova M, Zvezdaryk K, Ferris M, Shan B, Morris CA, Sullivan DE. Human cytomegalovirus infection dysregulates the canonical Wnt/beta-catenin signalling pathway. *PLoS Pathog* 2012; 8(10): e1002959.

189. Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 2006; 27:939-58
190. Zhou Y, Gormley MJ, Hunkapiller NM i sur. Reversal of gene dysregulation in cultured cytotrophoblasts reveals possible causes of preeclampsia. *J Clin Invest* 2013; 123:2862-72
191. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 1989;298:564-67
192. Seckl JR, Meaney MJ. Glucocorticoid programming. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1032:63-84
193. Fowden AL. Endocrine regulation of fetal growth. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:351-63
194. Bauer MK, Harding JE, Bassett NS i sur. Fetal growth and placental function. *Mol Cell Endocrinol* 1998;140:115-20
195. Dražančić A, Pevec-Stupar R, Kern J. Fetal growth in Zagreb. *Jugosl Ginekol Perinatol* 1988;28:13-20
196. Kuvačić I, Škrablin-Kučić S. ur. *Perinatologija danas*. Zagreb: Nakladni zavod Matice hrvatske; 2003
197. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003;69:1-7
198. Ishikawa T, Tamai Y, Zorn AM i sur. Mouse Wnt receptor gene *Fzd5* is essential for yolk sac and placental angiogenesis. *Development* 2001;128:25-33
199. Galceran J, Farinas I, Depew MJ, Clevers H, Grosschedl R. *Wnt3a*^{-/-}-like phenotype and limb deficiency in *Lef1*^{-/-}*Tcf1*^{-/-} mice. *Genes Dev* 1999;13:709-17
200. Fedorova L, Gatto-Weis C, Smaili S i sur. Down regulation of the transcription factor Snail in the placentas of patients with preeclampsia and in rat model of preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol* 2012;10:15-26
201. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension* 2008; 51(4):970-75
202. Burton GJ, Jones CJ. Syncytial knots, sprouts, apoptosis and trophoblast deportation from the human placenta. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2009;48(1):28-37
203. Huppertz B. IFPA Award in placentology lecture: biology of the placental syncytiotrophoblast – myths and facts. *Placenta* 2010;31 (Suppl): 575-81
204. Cindrova-Davies T. Gabor Than Award lecture 2008: pre-eclampsia –from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction. *Placenta* 2009; 30 (Suppl. A):555-65
205. Rosario GX, Ain R, Kanna T, Soares MJ. Intrauterine fate of invasive trophoblast cells. *Placenta* 2009;30 (5):457-63
206. Brown LM, Lacey HA, Baker PN, Crocker P. E-cadherin in the assessment of aberrant placental cytotrophoblast turnover in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Histochem Cell Biol* 2005;124(6):499-506

207. Al-Nasiry S, Vercruysse L, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. Interstitial trophoblastic cell fusion and E-cadherin immunostaining in the placental bed of normal and hypertensive pregnancies. *Placenta* 2009;30(8):719-25
208. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139(5):871-90
209. Lopez-Novoa JM, Nieto MA. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med* 2009; 1(6-7):303-14
210. Zhou BP, Deng J, Xia W i sur. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2004; 6(10):931-40
211. Vinas-Castels R, Beltran M, Valls G i sur. The hypoxia-controlled FBXL14 ubiquitin ligase targets SNAIL1 for proteasome degradation. *J Biol Chem* 2010; 285(6):3794-850
212. Steegers FA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet* 2010;376(9741):631-44
213. Baig S, Kothandaraman N, Manikandan J i sur. Proteomic analysis of human placental syncytiotrophoblast microvesicles in preeclampsia. *Clinical Proteomics* 2014;11:40-8
214. Knight M, Redman CWG, Linton EA, Sargent IL. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105:632-40
215. Schaffir JA, Lockwood CJ, Lapinski R, Yoon L, Alvarez M. Incidence of pregnancy- induced hypertension among gestational diabetics. *Am J Perinatol* 1995; 12(4):252-4
216. Solomon CG, Seely EW. Brief review: hypertension in pregnancy: a manifestation of the insulin resistance syndrome? *Hypertension* 2001; 37(2):232-9
217. Bljajić D. Hipertenzija i dijabetična trudnoća. U: Đelmiš J, Ivanišević M, Metelko Ž i sur. *Dijabetes u žena*. Zagreb: Medicinska naklada; 2009, str. 333-6
218. Shaw LM. Identification of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 as signalling intermediates in the alpha-6-beta-4-integrin dependent activation of phosphoinositide 3-OH kinase and promotion of invasion. *Mol Cell Biol* 2001;21: 5082-93
219. Castelluci M, De Matteis R, Meisser A i sur. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod* 2000;6:951-8
220. Staff AC, Ranheim T, Henriksen T, Halvorsen B. 8-iso-prostaglandin f (2 alpha) reduces trophoblast invasion and matrix metalloproteinase activity. *Hypertension* 2000;35:1307-13
221. Skrha J. Pathogenesis of angiopathy in diabetes. *Acta Diabetol* 2003;40 (Suppl 2):324-9
222. Hadlock FP, Harrist RB, Sharman RS, Deter RL, Park SK. Estimation of fetal weight with the use of head, body, and femur measurements- a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 1985;151:333-7

223. Almasry SM, Elfayomy AK. Morphometric analysis of terminal villi and gross morphological changes in the placentae of term idiopathic intrauterine growth restriction. *Tissue Cell* 2012; 44(4):214-9.
224. American College of Obstetricians and Gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. ACOG Practice Bulletin No 33. *Obstet Gynecol* 2002;99:159-67
225. Fishman RHB. Debate over diabetes in pregnancy study. *Lancet* 1995; 345:915-21
226. Kališnik M. Temelji stereologije. *Acta Stereol* 1985;4 (suppl 1):1-148
227. Wicksell SD. The corpuscle problem. A mathematical study of a biometric problem. *Biometrika* 1925;17:84-99
228. Babawale MO, Van Noorden S, Pignatelli M, Stamp GW, Elder MG, Sullivan MH. Morphological interactions of human first trimester placental villi co-cultured with decidual explants. *Hum Reprod* 1996; 11:444-50
229. Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;92:35-43
230. Pijneneborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta* 1980;1:3-19
231. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 1997;99:2152-64
232. Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA i sur. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1991;98:648-55
233. Zhang Z, Zhang L, Zhang L, Jia L, Wang P, Gao Y. Association of Wnt2 and sFRP4 expression in the third trimester placenta in women with severe preeclampsia. *Reprod Sci* 2013; 20(8):981-89
234. Yung HW, Atkinson D, Champion-Smith T, Olovsson M, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Differential activation of placental unfolded protein response pathways implies heterogeneity in causation of early- and late-onset pre-eclampsia. *J Pathol* 2014;234(2):262-76.
235. Figueras F, Savchev S, Triunfo S, Crovetto F, Gratacos E. An integrated model with classification criteria to predict small-for-gestational-age fetuses at risk of adverse perinatal outcome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:279-85
236. Kozuki N, Katz J, Lee AC i sur. Short maternal stature increases risk of small-for-gestational-age and preterm births in low- and middle-income countries: individual participant data meta-analysis and population attributable fraction. *J Nutr* 2015;145(11):2542-50.
237. Hewitt DP, Mark PJ, Dharmarajan AM, Wadell BJ. Placental expression of secreted frizzled related protein-4 in the rat and the impact of glucocorticoid-induced fetal and placental growth restriction. *Biol Reprod* 2006;75:75-81
238. Roberts JM, Lain KY. Recent insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta* 2002;23:359-72

239. Hrštic I, Ostojić R. Metabolički sindrom. U: Đelmiš J, Ivanišević M, Metelko Ž i sur. Dijabetes u žena. Zagreb: Medicinska naklada; 2009, str. 87-93
240. Đelmiš J. Gestacijski dijabetes. U: Đelmiš J, Ivanišević M, Metelko Ž i sur. Dijabetes u žena. Zagreb: Medicinska naklada; 2009, str. 325-32
241. Xu G, Guimond MJ, Chakraborty C, Lala PK. Control of proliferation, migration, and invasiveness of human extravillous trophoblast by decorin, a decidual product. *Biol Reprod* 2002; 67 (2):681-9
242. Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Piersbacher MD, Okada Y. Degradation of decorin by matrix metaloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor - β 1 release. *Biochem J* 1997;322:809-14
243. Delorme MA, Xu L, Berry L, Mitchell L, Andrew M. Anticoagulant dermatan sulphate proteoglycan (decorin) in the term human placenta. *Thromb Res* 1998; 90:147-53
244. Borbely AU, Daher S, Ishigai MM i sur. Decorin and biglycan immunolocalisation in non-villous structures of healthy and pathological human placentas. *Histopathology* 2014;64 (5):616-25
245. Tantbirojn P, Crum CP, Parast MM. Pathophysiology of placenta creta: the role of decidua and extravillous trophoblast. *Placenta* 2008;29(7):639-45
246. Hannon T, Innes BA, Lash GE, Bulmer JN, Robson SC. Effects of local decidua on trophoblast invasion and spiral artery remodelling in focal placenta creta – an immunohistochemical study. *Placenta* 2012;33(12):998-1004
247. Laban M, Ibrahim EA, Elsafty MS, Hassanin AS. Placenta accreta is associated with decreased decidual natural killer (dNK) cells population: a comparative pilot study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;181:284-8
248. Fisher SJ, Cui T, Zhang L i sur. Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro. *J Cell Biol* 1989;109:891-902
249. Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML i sur. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol* 1991;113:437-49
250. Genbacev O, Jensen KD, Powlin SS, Miller RK. In vitro differentiation and ultrastructure of human extravillous trophoblast (EVT) cells. *Placenta* 1993;14:463-75
251. Vicovac L, Papic N, Aplin JD. Tissue interactions in first trimester trophoblast-decidua co-cultures. *Trophoblast Res* 1993;7:223-26
252. Genbacev O, McMaster MT, Fisher SJ. A repertoire of cell cycle regulators whose expression is coordinated with human cytotrophoblast differentiation. *Am J Pathol* 2000;157:1337-51
253. Graham CH, Lala PK. Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. *J Cell Physiol* 1991;148:228-34
254. Lala PK, Hamilton GS. Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue. *Placenta* 1996;17:545-55
255. Iozzo RV, Moscatello DK, McQuillan DJ, Eichstetter I. Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1999;274:4489-92

256. Moscatello DK, Santra M, Mann DM, McQuillan DJ, Wong AJ, Iozzo RV. Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest* 1998;101:406-12
257. Lysiak JJ, Conelly IH, Khoo NKS, Stetler-Stevenson W, Lala PK. Role of transforming growth factor - α and epidermal growth factor (EGF) on proliferation and invasion by first trimester human trophoblast. *Trophoblast Res* 1994;8:455-67
258. Irving JA, Lysiak JJ, Graham CH, Han VKM, Hearn S, Lala PK. Characteristics of trophoblast cells migrating from first trimester chorionic villus explants and propagated in culture. *Placenta* 1995;16:413-33
259. Irving JA, Lala PK. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF- β , IGF-II and IGFBP-1. *Exp Cell Res* 1995;217:419-27
260. Gleeson LM, Chakraborty C, McKinnon T, Lala PK. Insulin-like growth factor binding protein-1 stimulates human trophoblast migration by signalling through $\alpha 5\beta 1$ integrin via mitogen-activated protein kinase pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:2484-93
261. Graham CH, Connelly IH, MacDougall JR, Kerbel RS, Stetler-Stevenson WG, Lala PK. Resistance of malignant trophoblast cells to both anti-proliferation and anti-invasive effects of transforming growth factor- β . *Exp Cell Res* 1994;214:93-9
262. Santra M, Mann DM, Mercer EW, Skorski T, Calabretta B, Iozzo RV. Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Clin Invest* 1997;100:149-57
263. Nash MA, Loercher AE, Freedman RS. In vitro growth inhibition of ovarian cancer cells by decorin: synergism of action between decorin and carboplatin. *Cancer Res* 1999;59:6192-96
264. Merle B, Durussel L, Delmas PD, Clezardin P. Decorin inhibits cell migration through a process requiring its glycosaminoglycan side chain. *J Cell Biochem* 1999; 75:538-46
265. Wehrum MJ, Buhimschi IA, Salafia C i sur. Accreta complicating complete placenta previa is characterized by reduced systemic levels of vascular endothelial growth factor and epithelial-to-mesenchymal transition of the invasive trophoblast. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204 (5):411e1-411e11
266. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76
267. Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen – a review. *Placenta* 2000;21(Suppl A):16-24
268. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 1997;277:1669-72
269. Bandeira CL, Borbely AU, Francisco RPV, Schultz R, Zugaib M, Bevilacqua E. Tumorigenic factor CRIPTO-1 is immunolocalized in extravillous cytotrophoblast in placenta creta. *BioMed Research International* 2014; 2014: doi 10.1155/2014/892856

270. Ebert AD, Wechselberger C, Frank S i sur. Cripto-1 induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent phosphorylation of AKT and glycogen synthase kinase 3 β in human cervical carcinoma cells. *Cancer Res* 1999;59 (18):4502-5
271. Mancino M, Strizzi L, Wechselberger C i sur. Regulation of human Cripto-1 gene expression by TGF- β 1 and BMP-4 in embrional and colon cancer cells. *J Cell Physiol* 2008;215(1):192-203
272. He B, Lee AY, Dadfarmay S i sur. Secreted frizzled-related protein 4 is silenced by hypermethylation and induces apoptosis in beta-catenin-deficient human mesothelioma cells. *Cancer Res* 2005;65(3):743-8
273. Huang D, Yu B, Deng Y i sur. SFRP4 was overexpressed in colorectal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136(3):395-401.
274. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 2001; 61:6050-4
275. Hirata H, Hinoda Y, Ueno K, Majid S, Saini S, Dahiya R. Role of Secreted frizzled-related protein 3 in human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2010; 70(5):1896-905
276. Wang S, Krinks M, Lin K, Luyten FP, Moos M. Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* 1997;88:757-66
277. Kemp C, Willems E, Abdo S, Lambiv L, Leyns L. Expression of all Wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and postimplantation development. *Developmental Dynamics* 2005;233:1064-75
278. Zhao X, Huang H, Chen Y i sur. Dynamic expression of secreted frizzled-related protein 3 (sFRP3) in the developing mouse spinal cord and dorsal root ganglia. *Neuroscience* 2013;17:594-601
279. Suzuki H, Watkins DN, Jair KW i sur. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive Wnt signalling in colorectal cancer. *Nat Genet* 2004;36:417-22
280. Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP i sur. SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13636-41
281. Zi X, Guo Y, Simoneau AR i sur. Expression of Frzb/secreted frizzled-related protein 3, a secreted Wnt antagonist in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells suppresses tumor growth and cellular invasiveness. *Cancer Res* 2005;65:9762-70
282. Saini S, Liu J, Yamamura S i sur. Functional significance of secreted frizzled-related protein 1 in metastatic renal cell carcinomas. *Cancer Res* 2009;69:6815-22
283. Nikuševa-Martić T, Serman L, Zeljko M i sur. Expression of secreted Frizzled-related protein 1 and 3, T-cell factor 1 and lymphoid enhancer factor 1 in clear cell renal cell carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2013;19(3):545-51
284. Kephart JJ, Tiller RG, Crose LE i sur. Secreted Frizzled-related protein 3 (SFRP3) is required for tumorigenesis of PAX3-FOXO1-positive alveolar rhabdomyosarcoma. *Clin Cancer Res* 2015;12:1-13
285. Pukrop T, Klemm F, Hagemann T i sur. Wnt 5A signalling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:5454-9

286. Foronjy R, Imai K, Shiomi T i sur. The divergent roles of secreted Frizzled related protein-1 (SFRP1) in lung morphogenesis and emphysema. *AJP* 2010;177 (2):598-607
287. Nakano H, Shimada A, Imai K, Takahashi K, Hashizume K. The cytoplasmic expression of E-cadherin and β -catenin in the bovine trophoblasts during binucleate cell differentiation. *Placenta* 2005;26:393-401
288. Getsios S, Chen GT, MacCalman CD. Regulation of β -catenin mRNA and protein levels in human villous cytotrophoblasts undergoing aggregation and fusion in vitro: correlation with E-cadherin expression. *J Reprod Fertil* 2000;119:59-68
289. Dash PR, Whitley GS, Ayling LJ, Johnstone AP, Cartwright JE. Trophoblast apoptosis is inhibited by hepatocyte growth factor through the Akt and β -catenin mediated up-regulation of inducible nitric oxide synthase. *Cell Signal* 2005;17:571-80
290. Buchanan TA, Xiang A, Kjos SL, Watanabe R. What is gestational diabetes? *Diabetes Care* 2007;30 (Suppl 2):105-11
291. Zorn TM, Zuniga M, Madrid E i sur. Maternal diabetes affects cell proliferation in developing rat placenta. *Histol Histopathol* 2011;26:1049-56
292. Magee TR, Ross MG, Wedekind L, Desai M, Kjos S, Belkacemi L. Gestational diabetes mellitus alters apoptotic and inflammatory gene expression of trophoblasts from human term placenta. *J Diabetes Complications* 2014;28:448-59
293. Acar N, Korgun ET, Ustunel I. Cell cycle inhibitor p57 expression in normal and diabetic rat placentas during some stages of pregnancy. *Histol Histopathol* 2012;27:59-68
294. Farias PS, dos Santos Souza K, Fioretto ET, dos Santos MR, Aires MB. Maternal diabetes affects rat placental morphology and pregnancy. *Endocrine* 2014; 45:497-501
295. Higgins M, Mc Auliffe F. A review of maternal and fetal growth factors in diabetic pregnancy. *Curr Diabetes Rev* 2010;6:116-25
296. Kos M. Patološko anatomske promjene placente, fetusa i novorođenčeta dijabetičnih trudnoća. U: Đelmiš J, Ivaišević M, Metelko Ž. i sur. *Dijabetes u žena*. Zagreb: Medicinska naklada; 2009, str. 360-70
297. Teasdale F. Histomorphometry of the placenta of the diabetic women: class A diabetes mellitus. *Placenta* 1981;2:241-51
298. Figueroa R, Omar H, Tejani N, Wolin M. Gestational diabetes alters human placental vascular responses to changes in oxygen tension. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1616-22
299. Korgun ET, Unek G, Herrera E i sur. Mapping of CIP/KIP inhibitors, G1 cyclinsD1, D3, E and p53 proteins in the rat term placenta. *Histochem Cell Biol* 2011;136:267-78
300. De Falco M, Fedele V, Cobellis L i sur. Pattern of expression of cyclin D1/CDK4 complex in human placenta during gestation. *Cell Tissue Res* 2004;317:187-94

301. Unek G, Ozmen A, Mendilcioglu I, Simsek M, Korgun ET. Immunohistochemical distribution of cell cycle proteins p27, p57, cyclin D3, PCNA and Ki67 in normal and diabetic human placentas. *J Mol Histol* 2014;45:21-34
302. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994;79:551-5
303. Noble JA, White AM, Lazzeroni LC i sur. A polymorphism in the TCF7 gene C883A, is associated with type 1 diabetes. *Diabetes* 2003;52(6):1579-82
304. Mao H, Li Q, Gao S. Meta-analysis of the relationship between common type 2 diabetes risk gene variants with gestational diabetes mellitus. *PloS One* 2012;7(9):e45882
305. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2009; 373:1773-9
306. Williams MA, Qiu C, Dempsey JC, Luthy DA. Familial aggregation of type 2 diabetes and chronic hypertension in women with gestational diabetes mellitus. *J Reprod Med* 2003;48:955-62
307. Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2005; 115:485-91
308. Zhang C, Bao W, Rong Y i sur. Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2013;19(4):376-90
309. Lee SH, Demeterco C, Geron I, Abrahamsson A, Levine F, Itkin-Ansari P. Islet specific Wnt activation in human Type II diabetes. *Exp Diabetes Res* 2008;2008:728763
310. Shih le M, Hsu MY, Oldt RJ, Herlyn M, Gearhart JD, Kurman RJ. The role of E-cadherin in the motility and invasion of implantation site intermediate trophoblast. *Placenta* 2002; 23:706-15
311. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I i sur. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transition by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000;2:76-83
312. Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oram KF, Gridley T. The mouse Snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 2001; 21:8184-8
313. Batlle E, Sancho E, Franci C i sur. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000;2:84-9
314. De Craene B, Gilbert B, Stove C, Bruyneel E, van Roy F, Berx G. The transcription factor Snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res* 2005;65:6237-44
315. Arimoto-Ishida E, Sakata M, Sawada K i sur. Up-regulation of alpha 5 –integrin by E-cadherin loss in hypoxia and its key role in the migration of extravillous trophoblast cells during early implantation. *Endocrinology* 2009;150(9):4306-15
316. Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE i sur. Rac 1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 2005;436(7047):123-7

317. Rajakumar A, Brandon HM, Daftary A, Ness R, Conrad KP. Evidence for the functional activity of hypoxia –inducible transcription factors overexpressed in preeclamptic placentae. *Placenta* 2004;25(10):763-9
318. Rajakumar A, Michael HM, Daftary A, Jeyabalan A, Gilmour C, Conrad KP. Proteosomal activity in placentas from women with preeclampsia and intrauterine growth restriction: implications for expression of HIF-alpha proteins. *Placenta* 2008; 29(3):290-9
319. Huppertz B. Placental pathology in pregnancy complications. *Thromb Res* 2011;127 (Suppl 3):96-9

11. BIOGRAFIJA

Jasenska Zmijanac Partl dr. med. rođena je 1962. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1986. godine. Obavezni staž odradila je u DZ „Trešnjevka“ te je 1987. položila stručni ispit. Specijalizirala je ginekologiju i opstetriciju u OB „Sv. Duh“ a zatim subspecijalizirala fetalnu medicinu i opstetriciju u KB Merkur.

Sudjelovala je u organizaciji UZV tečajeva I kategorije (KB Merkur). Završila je program edukacije 3 D VISUS (Vienna International School of 3D Ultrasonography, International Academy of Medical Ultrasound) 2008. godine.

2014. godine završila je doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“.

Zaposlena je kao specijalist ginekologije i porodništva na Klinici za ženske bolesti i porode KB Merkur u Zagrebu, gdje radi u Zavodu za perinatalnu medicinu.

Aktivno se služi engleskim i francuskim jezikom. U dosadašnjem radu autor je ili koautor 6 radova indeksiranih u Current Contents-u, 7 radova indeksiranih u drugim međunarodnim indeksima te je autor ili koautor u 24 poglavlja u stručnim knjigama.

Bavila se i prevođenjem s francuskog jezika (Larousse Enciklopedija za roditelje, Larousse Zdravlje žene), te je bila i stručni redaktor u poglavljima vezanim uz ginekologiju u obje knjige.

Udata je i majka jednog djeteta.