

Spolne razlike u izraženosti posteljičnog vaskularnog endotelnog čimbenika rasta

Živković, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:384306>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2021-12-06**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Josip Živković

**Spolne razlike u izraženosti posteljičnog
vaskularnog endotelnog čimbenika rasta**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2019.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Josip Živković

**Spolne razlike u izraženosti posteljičnog
vaskularnog endotelnog čimbenika rasta**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Aida Salihagić Kadić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./2019.

Mentor rada: prof. dr. sc. Aida Salihagić Kadić

Popis kratica

VEGF- vascular endothelial growth factor	vaskularni endotelni čimbenik rasta
VEGFR- vascular endothelial growth factor receptor	receptor za vaskularni endotelni čimbenik rasta
sVEGFR1- soluble vascular endothelial growth factor receptor 1	topljivi oblik receptora za vaskularni endotelni čimbenik rasta
PIGF- placental growth factor	posteljični čimbenik rasta
IUGR- intrauterine growth restriction	intrauterini zastoj u rastu
TGF- β - transforming growth factor β	transformirajući čimbenik rasta β
TNF- tumor necrosis factor	čimbenik tumorske nekroze
FGF- fibroblast growth factor	fibroblastni čimbenik rasta
EGF- epidermal growth factor	epidermalni čimbenik rasta
PDGF- platelet derived growth factor	trombocitni čimbenik rasta
IGF- insulin like growth factor	inzulinu sličan čimbenik rasta
IGFBP- insulin like growth factor binding protein	protein koji se veže na inzulinu sličan čimbenik rasta
HIF-1 α - hypoxia inducible factor 1 α	hipoksijom inducirani čimbenik 1 α
HIF-1 β - hypoxia inducible factor 1 β	hipoksijom inducirani čimbenik 1 β
HRE- hypoxia response elements	elementi koji reagiraju na hipoksiju
FPR- fetoplacental ratio	fetoplacentarni omjer
11 β -HSD-2- 11 β hydroxysteroid dehydrogenase type 2	11 beta hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 2
GLUT1- glucose transporter 1	prijenosnik glukoze 1
ADHD- attention deficit hyperactivity disorder	poremećaj pozornosti s hiperaktivnošću
PBS- phosphate buffer saline	fosfatni pufer

Sadržaj

I. Uvod	1
I.1 Razvoj i funkcije posteljice	1
I.2 Signalne molekule u razvoju posteljice	2
I.3 Vaskularni endotelni čimbenik rasta	3
I.3.1 Funkcije vaskularnog endotelnog čimbenika rasta u posteljici	3
I.3.1.1 Vaskulogeneza	4
I.3.1.2 Angiogeneza	4
I.3.1.2.1 Granajuća angiogeneza	4
I.3.1.2.2 Negranjuća angiogeneza	5
I.4 Regulacija izraženosti VEGF-a	5
I.5 Insuficijencija posteljice i intrauterini zastoj u rastu	6
I.6 Vaskularni endotelni čimbenik rasta u normalnim trudnoćama i u trudnoćama sa zastojem u rastu	6
I.7 Spolne razlike u funkciji posteljice	7
I.8 Uloga VEGF-A u liječenju zastoja u rastu	9
I.9 Hipoteza i ciljevi	10
II. Materijali i metode	11
III. Rezultati	13
IV. Rasprava	18
V. Zaključak	26
VI. Zahvale	27
VII. Literatura	28
VIII. Životopis	35

Sažetak

Naslov rada: Spolne razlike u izraženosti posteljičnog vaskularnog endotelnog čimbenika rasta

Autor: Josip Živković

Uvod

Za normalan razvoj i funkcioniranje posteljice nužni su čimbenici rasta poput vaskularnog endotelnog čimbenik rasta A (VEGF-A od eng. *Vascular endothelial growth factor A*) koji sudjeluje u stvaranju krvnih žila posteljice procesom angiogeneze i vaskulogeneze. Insuficijentan razvoj posteljice uzrok je intrauterinog zastoja u rastu (IUGR od eng. *Intrauterine growth restriction*) fetusa. Nadalje, poznato je da postoje spolne razlike u funkciji posteljice koje se očituju na razini gena i kasnijoj prilagodbi fetusa na stres. Pretpostavka ovog istraživanja je da postoje i spolne razlike u izraženosti VEGF-A u posteljicama iz normalnih trudnoća i trudnoća kompliciranih IUGR-om. Ciljevi su istraživanja utvrditi postoji li razlika u izraženosti posteljičnog VEGF-A između normalnih trudnoća i trudnoća sa zastojem u rastu, te je li se te razlike opažaju ovisno o spolu djeteta.

Materijali i metode

U istraživanje su bile uključene 32 trudnice, 16 iz normalnih (kontrola) i 16 iz trudnoća s IUGR-om. U svakoj skupini trudnice su nosile po 8 muške i 8 ženske djece. Mjereni parametri bili su gestacijska dob, porođajna masa, masa posteljice, fetoplacentarni omjer (FPR od eng. *Feto-placental ratio*) i imunohistokemijska izraženost VEGF-A koja je mjerena semikvantitativno.

Rezultati

Između kontrolne i IUGR skupine statistički značajna razlika opazila se u izraženosti VEGF-A ($p=0,005$) koja je povećana u IUGR skupini, porođajnoj masi ($p<0,001$) i masi posteljice ($p<0,001$). Između dvije skupine postoji statistički značajna razlika u gestacijskoj dobi, ali ona nije klinički značajna. Izraženost VEGF-A po spolu unutar kontrolne i IUGR skupine te među njima nije se statistički razlikovala ($p>0,05$), iako je češće povećana kod IUGR skupine, posebice u ženskim posteljicama. Statistički značajna razlika po spolu između tih skupina opazila se u porođajnoj masi ($p<0,001$), masi posteljice ($p<0,001$) i gestacijskoj dobi ($p=0,001$).

Zaključak

Izraženost posteljičnog VEGF-A razlikuje se između normalnih trudnoća i trudnoća sa zastojem u rastu. Razlika izraženosti VEGF-a nije se opazila prilikom usporedbe te dvije skupine po spolu, dok je između skupina pronađena spolna razlika u porođajnoj masi, masi posteljice i gestacijskoj dobi.

Ključne riječi: intrauterini zastoj u rastu, vaskularni endotelni čimbenik rasta, posteljica, spolne razlike, genska terapija

Summary

Title: Sex differences in expression of placental vascular endothelial growth factor

Author: Josip Živković

Introduction

Normal development and function of placenta requires growth factors such as vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) which creates placental blood vessels in processes of angiogenesis and vasculogenesis. Insufficient development of placenta is cause of fetal intrauterine growth restriction (IUGR). Furthermore, it is known that there are sex differences in function of placenta in genes and fetal adaptation to stress events. The hypothesis of this study is that there are sex differences in expression of placental VEGF-A between normal pregnancies and pregnancies complicated with IUGR. Aims of this study are: to determine if there are sex differences in expression of placental VEGF-A between normal pregnancies and pregnancies complicated with IUGR, and are those differences sex related.

Materials and methods

This study included 32 pregnant women, 16 from normal pregnancies (control) and 16 from IUGR pregnancies. In every group women were carrying 8 male and 8 female children. Measured parameters were gestation length, birth weight, placental weight, feto-placental ratio (FPR) and expression of VEGF-A, which was measured semiquantitatively.

Results

Between control and IUGR group there was statistically significant difference in expression of VEGF-A ($p=0.005$) which was elevated in IUGR group, birth weight ($p<0.001$) and placenta weight ($p<0.001$). There is statistically significant difference in gestation length between these two groups, but without clinical significance. Sex differences in expression of placental VEGF-A within each control and IUGR group and between them were not statistically significant ($p>0.05$), although it is more often elevated in IUGR group, especially in female placentas. When considering sex, statistically significant differences between these groups were observed in birth weight ($p<0.001$), placental weight ($p<0.001$) and gestation length ($p=0.001$).

Conclusion

There are differences in expression of placental VEGF-A between normal pregnancies and pregnancies complicated with IUGR. Difference in expression of VEGF-A was not observed between these two groups when considering sex, but was evident in birth weight, placenta weight and gestation length.

Keywords: intrauterine growth restriction, vascular endothelial growth factor, placenta, sex differences, gene therapy

I. Uvod

Posteljica je organ koji povezuje majku i fetus te je građena od stanica obaju organizama. Ona je organ koji progresivno raste tijekom trudnoće, a uloga joj je omogućiti dovoljan rast i razvoj fetusa kao nužne preduvjete za život izvan maternice. Njezin razvoj precizno je reguliran različitim čimbenicima rasta i podražajima koji potječu i od majke i od fetusa, a poremećaji koji sprječavaju rast odražavaju se na fetus i majku. Ako dođe do insuficijencije posteljice te smanjene opskrbe ploda kisikom i hranjivim tvarima razvija se intrauterini zastoj rasta ploda.

I.1 Razvoj i funkcije posteljice

Posteljica je privremeni organ koji je posrednik između majke i fetusa, a njezino stvaranje započinje implantacijom blastociste u endometrij. Trofoblast blastociste odgovoran je za stvaranje posteljice, a diferencira se u citotrofoblast i sinciotrofoblast, od kojih ovaj zadnji dolazi u kontakt sa sinusoidama endometrija, čime majčina krv dolazi u dodir sa stanicama embrija. To je prvi korak u uspostavljanju krvne opskrbe embrija, a i u nastajanju posteljice (1).

Krvna opskrba posteljice započinje stvaranjem primarnih resica. Mezodermalne stanice žumanjčanje vreće prodiru u primarne resice te nastaju sekundarne resice, a diferencijacijom tih stanica nastaju tercijarne resice. Tercijarne resice koje se protežu od korionske ploče i pričvršćene su za deciduu basalis nazivaju se usidrene resice. Njihovim grananjem i produljivanjem, proliferacijom postojećih i stvaranjem novih endotelnih stanica, one podliježu strukturnim promjenama koje u konačnici stvaraju terminalne resice (ili slobodne resice). U njima se odvija izmjena plinova između majke i fetusa difuzijom, te aktivnim i pasivnim transportom (2). Spajanjem krvnih žila koje potječu iz korionskih resica s onima koje se stvaraju u korionskoj ploči stvara se ekstraembrionalni vaskularni sustav. Citotrofoblast usidrenih resica invadira spiralne arterije decidue basalis, mijenja njihova svojstva i dolazi do izlivanja majčine krvi u intervilozni prostor čime počinje normalno funkcioniranje posteljice.

Posteljica ima brojne funkcije, a najvažnije su transport hranjivih tvari i kisika, proizvodnja hormona i zaštita fetusa od utjecaja iz okoline. Prije samog nastajanja korionskih resica trofoblast fagocitira produkte sekrecije žlijezda endometrija u kojima se nalaze hranjive tvari koje će fetusu omogućiti privremenu prehranu dok se ne uspostavi uteroplacentarni

krvotok (3). Nakon uspostave krvotoka transport kisika i ugljikovog dioksida odvija se jednostavnom difuzijom. Glukoza se prenosi iz majčine krvi pomoću olakšane difuzije putem prijenosnika za glukozu tipa 1 (GLUT1 od eng. *glucose transporter 1*), dok se aminokiseline i elektroliti prenose aktivnim transportom. Lipidi se u posteljicu prenose lipoproteinima i hidroliziraju lipoprotein lipazom. Posteljica kao privremeni organ ima i endokrinu funkciju kojom normalno održava trudnoću, a najvažniji hormoni koje ona luči su estrogeni, humani korionski gonadotropin, humani placentarni laktogen i placentarni hormon rasta (4). Zaštitna funkcija posteljice očituje se u metabolizmu lijekova koji dolaze majčinim krvotokom, prijenosu pasivne imunosti od majke te djelovanju kao barijere protiv infektivnih uzročnika.

I.2 Signalne molekule u razvoju posteljice

Uredan razvoj posteljice složen je proces koji je reguliran različitim signalnim molekulama. Neke od tih molekula sintetizira embrij, a neke majka, te njihovo uzajamno djelovanje dovodi do različitih procesa u blastocisti, odnosno trofoblastu te potiče njegovu invaziju u endometriju i daljnju diferencijaciju čiji je konačni rezultat stvaranje posteljice. Inzulinu sličan čimbenik rasta (IGF od eng. *Insulin like growth factor*) posreduje u rastu, diferencijaciji, preživljenju i metabolizmu stanica citotrofoblasta vežući se na svoje receptore. Povećava transport aminokiselina u posteljicu i njenu površinu dostupnu za prijenos različitih molekula, a vezanjem za transportni protein inhibira svoje djelovanje i time potiče invaziju trofoblasta u deciduu (5). Transformirajući čimbenik rasta β (TGF- β od eng. *Transforming growth factor β*) ima slične funkcije kao IGF, no u trudnoći on inhibira migraciju i invaziju ekstraviloznog trofoblasta (6), a istraživanja na ljudima i životinjama nisu pokazala jednoznačne rezultate o inhibiciji ili proliferaciji citotrofoblasta i njegove transformacije u sinciciotrofoblast (7). Epidermalni čimbenik rasta (EGF od eng. *Epidermal growth factor*) potiče stanice na proliferaciju i trofoblast na diferencijaciju, a time potiče rast posteljice, dok je njegov manjak povezan s malim posteljicama i zastojem u rastu (8). Fibroblastni čimbenik rasta (FGF od eng. *Fibroblast growth factor*) također potiče proliferaciju trofoblasta, a uz to i njegovu migraciju i diferencijaciju u citotrofoblast (9). Trombocitni čimbenik rasta (PDGF od eng. *Platelet derived growth factor*) posreduje u proliferaciji i migraciji stanica trofoblasta, a njegova je smanjena izraženost povezana s fetalnim zastojem u rastu, dok je povećana u posteljicama makrosomne djece (5). Nadalje, veoma važnu funkciju u razvoju posteljice ima vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF od eng. *Vascular endothelial growth factor*).

I.3 Vaskularni endotelni čimbenik rasta

Ovaj je glikoprotein odgovoran za različite funkcije u organizmu, među ostalom za sam razvoj posteljice. On djeluje na endotelne stanice, a njegove funkcije su proliferacija stanica, povećanje propusnosti krvnih žila, migracija stanica, aktivacija te invazija endotela u okolno tkivo (10). Pod pojmom VEGF podrazumijevamo obitelj čimbenika rasta sačinjenu od 6 glikoproteina: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E i posteljičnog čimbenika rasta (PIGF od eng. *Placental growth factor*). U užem smislu kada se govori o VEGF-u onda se misli na VEGF-A. On ima više izoformi: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆ te njegova relativna molekulska masa varira od 34 do 45 kD i od svih ostalih članova obitelji VEGF, on je najizraženiji i najvažniji u posteljici. U normalnim tkivima najviše je, osim u posteljici, izražen u plućima, bubrezima, srcu te nadbubrežnim žlijezdama. VEGF-B ima dvije izoforme, VEGF-B₁₆₇ i VEGF-B₁₈₆ te je pretežito izražen u posteljici, miokardu, skeletnim mišićima i gušterači. VEGF-C je izražen u posteljici, srcu, jajnicima, tankom crijevu i štitnjači dok je VEGF-D izražen u srcu, plućima, skeletnom mišićju, tankom i debelom crijevu. *VEGF-E* se nalazi kao sastavni dio genoma nekih virusa (11). PIGF ima četiri izoforme te je izražen u posteljici tijekom čitave trudnoće, pretežito u trofoblastu (12). Nadalje, važno je naglasiti da VEGF svoje djelovanje posreduje pomoću 5 skupina receptora: receptor vaskularnog endotelnog čimbenika rasta 1 (VEGFR-1 od eng. *Vascular endothelial growth factor receptor 1*), VEGFR-2, VEGFR-3, neuropilina-1 i neuropilina-2. Uz njih još postoji topljivi oblik receptora (sVEGFR-1 od eng. *Soluble Vascular endothelial growth factor receptor 1*) koji veže slobodni VEGF i PIGF i time blokira njihovu funkciju. VEGF-A se u obliku homodimera ili u obliku heterodimera, VEGF/PIGF, može vezati za VEGFR-1 i VEGFR-2 dok se VEGF-B i PIGF u obliku homodimera mogu vezati samo za VEGFR-1. VEGF-C i VEGF-D vežu se za VEGFR-2 i VEGFR-3 dok se VEGF-E veže isključivo na VEGFR-2 (13).

I.3.1 Funkcije vaskularnog endotelnog čimbenika rasta u posteljici

Vaskularni endotelni čimbenik rasta primarno djeluje na endotelne stanice. Njegova prisutnost i prisutnost njegovih receptora u nastanku posteljice je nužna jer mutacija samo jednog njegovog alela dovodi do smrti ploda zbog izostanka stvaranja krvnih žila i cirkulacije (14). Jedni i drugi sudjeluju u procesima stvaranja krvnih žila, vaskulogenezi i angiogenezi.

I.3.1.1 Vaskulogeneza

Vaskulogeneza je proces stvaranja novih krvnih žila iz mezenhimskih stanica. Ona započinje oko 21 dana nakon oplodnje pretvorbom nediferenciranih mezenhimalnih stanica u hemangioblaste koji urastaju i migriraju na periferiju primarnih resica te oko 28 dana nakon oplodnje stvaraju endotelne stanice. One formiraju cjevaste strukture sekundarnih resica, odnosno prve krvne žile unutar kojih se već 32 dana nakon oplodnje mogu naći eritrociti, također stvoreni iz hemangioblasta. Čitav proces vaskulogeneze može se podijeliti u tri stupnja: 1. indukcija hemangioblasta i angioblasta koja je pod utjecajem FGF-a; 2. stvaranje primordijalnih krvnih žila pod utjecajem VEGF/VEGFR; 3. prijelaz iz vaskulogeneze u angiogenezu (15). VEGF u ovom procesu luče mezenhimalne stanice te posredstvom VEGFR-1 djeluje na hemangioblaste koji stvaraju hemangiogeni tračak i svojim urastanjem u trofoblast stvaraju primarne krvne žile. Diferencijacijom periferno smještenih hemangioblasta nastaju endotelne stanice, dok iz onih centralno smještenih nastaju eritrociti (16).

I.3.1.2 Angiogeneza

Angiogeneza je proces nastajanja novih krvnih žila iz već postojećih. On započinje oko 32. dana nakon oplodnje, u vrijeme kad je formiranje krvnih žila resica završeno te traje do kraja trudnoće. Tijekom tog čitavog procesa dolazi do stvaranja novih i razgradnje starih krvnih žila u svrhu poboljšanja perfuzije posteljice i stvaranja kapilarne petlje koja će imati dovoljnu površinu kako bi omogućila adekvatan prijenos kisika i hranjivih tvari do fetusa. Stoga se ta kapilarna petlja remodelira tijekom čitave trudnoće putem angiogeneze (15). Ona se dijeli na granajuću i ngranajuću angiogenezu.

I.3.1.2.1 Granajuća angiogeneza

U granajućoj angiogenezi nove krvne žile nastaju „pupanjem“ ili stvaranjem endotelne pregrade u starim krvnim žilama. Različiti čimbenici rasta, uključujući VEGF, svojim utjecajem dovode do razgradnje izvanstaničnog matriksa (ekstracelularnog matriksa) i bazalne lamine pomoću kolagenaza, povećavaju propusnost krvnih žila, kemotaksijom privlače endotelne stanice u taj prostor te potiču njihovu proliferaciju čime omogućuju stvaranje novih krvnih žila. Iz okolnog mezenhima stanice migriraju do bazalnih strana endotelnih stanica te stvaraju pericite koji će se diferencirati u glatke mišićne stanice novostvorenih krvnih žila (17). VEGF koji se luči iz stanica trofoblasta djeluje na VEGFR-1 pri čemu potiče stvaranje cjevastih

struktura obloženih endotelom, kao u vaskulogenezi, dok djelovanjem na VEGFR-2 potiče proliferaciju endotelnih stanica. Rezultat tih dviju kombinacija je granajuća angiogeneza (18).

I.3.1.2.2 Negranajuća angiogeneza

Negranajuća angiogeneza je proces elongacije (produživanja) postojećih krvnih žila posteljice. Ona započinje tek oko 24. tjedna trudnoće i traje do njezinog kraja, a karakterizirana je smanjenom proliferacijom trofoblasta, povećanom proliferacijom endotelnih stanica, rastom terminalnih resica, povećanom izraženošću PIGF i sVEGFR-1, a smanjenom VEGF-A (19). Zbog povećane koncentracije kisika u posteljici smanjuje se izraženost VEGF-A, a povećava PIGF-a. PIGF je izražen u trofoblastu, a vežući se kao homodimer isključivo na VEGFR-1 na endotelnim stanicama zaslužan je za negranajuću angiogenezu i stvaranje sincicijskih čvorića u terminalnim resicama. sVEGFR-1 veže slobodni VEGF i time onemogućava njegovo djelovanje, a omogućava negranajuću angiogenezu (2).

I.4 Regulacija izraženosti VEGF-a

VEGF je molekula koja nije konstantno prisutna u stanicama odraslog organizma dok se u posteljici nalazi tijekom gotovo čitave trudnoće. Njegova izraženost regulirana je hipoksijom, čimbenicima rasta, citokinima i hormonima koji djeluju direktno na njegov genski lokus unutar molekule DNA stvarajući više izoformi putem transkripcije, te na posttranskripcijske modifikacije.

Prvi od tih čimbenika je hipoksija koja je prisutna intrauterino tijekom implantacije. Prije implantacije embrij se prehranjuje uzimanjem hranjivih tvari koji su produkt sekrecije žlijezda endometrija, a u čitavom tom razdoblju nalazi se u hipoksičnim uvjetima. Nizak parcijalni tlak kisika djeluje na hipoksijom induciran čimbenik 1 α (HIF-1 α od eng. *Hypoxia inducible factor 1 α*) koji zajedno sa HIF-1 β čini heterodimer HIF-1, a ima svojstvo transkripcijskog faktora. Gen za VEGF-A ima na svojim 5' i 3' krajevima regije koje se nazivaju elementi koji reagiraju na hipoksiju (HRE od eng. *hypoxia response elements*). To su mjesta na koje se veže HIF-1 i započinje prepisivanje gena za VEGF (11).

Čimbenik tumorske nekroze α (TNF- α od eng. *Tumor necrosis factor- α*) je vrsta proupalnog citokina koji ima stimulatívno djelovanje na lučenje VEGF-a. Osim te funkcije uloga mu je i poticanje izraženosti VEGFR-2 u endotelnim stanicama krvnih žila (20). TGF- β i EGF povećavaju izraženost VEGF-A, a PDGF uz to povećava i izraženost VEGF-C, dok

različiti interleukini potiču izraženost VEGFR-2 (21,22). IGF-1 također potiče izraženost VEGF-A (23).

Hormonska stimulacija također regulira izraženost VEGF-a. Različita *in vitro* istraživanja na ljudskim stanicama karcinoma dojke pokazala su da estrogenska i progestinska stimulacija potiče izraženost VEGF-A te stabilizira i produžuje poluživot njezine mRNA (24). Sličnim istraživanjima pokazalo se da i testosteron povećava izraženost VEGF-A (25).

I.5 Insuficijencija posteljice i intrauterini zastoje u rastu

Poremećaj u invaziji trofoblasta u spiralne arterije dovodi do intrauterinog zastoja u rastu (IUGR od eng. *Intrauterine Growth Restriction*). To je poremećaj koji onemogućava fetusu da dostigne svoj genetski predodređeni potencijal rasta (26), a definira se kao porođajna masa manja od 10. percentile za gestacijsku dob. Čest je uzrok morbiditeta i mortaliteta dojenčadi (27), a osim ranih posljedica, dokazano je da je rizični čimbenik za razvoj bolesti odrasle dobi, kao što su neurološke, kardiovaskularne i bubrežne bolesti (28–31). Učestalost IUGR-a je 8-10% svih trudnoća (32), a najčešće nastaje zbog insuficijencije posteljice (32).

Insuficijencija posteljice započinje promjenom protoka krvi u fetalnoj cirkulaciji čime se javljaju metaboličke i endokrine promjene koje se najprije očituju u smanjenju rasta opsega abdomena (32), a daljnja nestašica nutrijenata vodi smanjenju fetalne mase. Zbog smanjenog protoka krvi u posteljici dolazi do centralizacije krvotoka prema vitalnim organima, u prvom redu prema mozgu. Taj zaštitni mehanizam naziva se efekt poštete mozga (eng. *brain sparing effect*) i može se otkriti primjenom Doppler ultrazvuka (33). Međutim, kompenzacijski mehanizmi u nekom trenutku prestaju biti učinkoviti i razvijaju se hipoksemija te cirkulacijska i metabolička dekompenzacija koji remete funkcioniranje vitalnih organa fetusa (34).

I.6 Vaskularni endotelni čimbenik rasta u normalnim trudnoćama i u trudnoćama sa zastojem u rastu

Kao što je već navedeno, obitelj VEGF-a nužna je za razvoj normalne posteljice. Tijekom vaskulogeneze glavnu ulogu igra VEGF-A. On je izražen u endovaskularnom, intramuralnom i intersticijskom ekstraviloznom trofoblastu, no osim ove izraženosti u fetalnim kotiledonima, u većim koncentracijama izražen je i u korionu i amnionu (35). Djeluje na mezenhimske stanice putem VEGFR-1 i VEGFR-2 i potiče njihovu proliferaciju te uz ostale čimbenika rasta i njihovu diferencijaciju. Nastankom tercijarnih resica i napredovanjem

trudnoće prema trećem tromjesečju utjecaj VEGF-A se smanjuje. Istraživanja pokazuju da se koncentracija VEGF-A tijekom čitave trudnoće ne smanjuje, već da mu funkciju antagonizira sVEGFR-1 vežući se na njega (36). S druge strane, koncentracija PIGF-a se u tom periodu postupno povećava kao i odvijanje procesa angiogeneze. Povećana oksigenacija povećava izraženost PIGF-a, a on je glavni medijator procesa angiogeneze jer posredstvom VEGFR-1 potiče proliferaciju endotelnih stanica te elongaciju i produljenje već postojećih krvnih žila unutar tercijarnih resica (37). VEGFR-1 je izražen u endovaskularom, intramuralnom i intersticijskom ekstraviloznom trofoblastu, dok se ta izraženost s napredovanjem trudnoće postupno smanjuje u endovaskularnom trofoblastu. Slično se događa i sa VEGFR-2, čija se izraženost također postupno smanjuje u endovaskularnom trofoblastu s napredovanjem trudnoće (38).

VEGF i njegovi receptori odgovorni za vaskulogenezu i angiogenezu u trudnoćama sa zastojem u rastu imaju promijenjenu izraženost, no nije jednoznačno dokazano je li se ona povećava ili smanjuje. Istraživanje na životinjskom modelu u kojih se inducirao IUGR pomoću visoke temperature, pokazalo je da je izraženost VEGF-A u tkivu posteljice smanjena. Ista studija pokazala je da je izraženost VEGFR-1 smanjena, dok je PIGF-a povećana (39). Ovakva izraženost tih čimbenika rasta govori u prilog tome da je u posteljici narušena i vaskulogenezu i angiogenezu, jer zbog smanjene izraženosti VEGF-A i VEGFR-1 nema normalne granajuće angiogeneze i formiranja zrelih posteljičnih terminalnih resica. Invazija trofoblasta u spiralne arterije je poremećena (40), a uz to je smanjena površina, volumen i broj terminalnih resica kao i broj kapilara u njima (17). Posljedica tih promjena je narušena histološka građa resica te je onemogućen adekvatan prijenos nutrijenata od majke prema fetusu i metabolita od fetusa prema majci. Količina sVEGFR-1 je u umbilikalnoj krvi u sličnim istraživanjima bila također povećana, što ide u prilog tome da je utjecaj VEGF-A u posteljicama smanjen (41). Istraživanje na ljudskim posteljicama pokazalo je da je izraženost VEGF-A povećana u trudnoćama sa zastojem u rastu (42). Istraživanja pokazuju oprečne rezultate te je potrebna njihova dodatna analiza kako bi se mogao donijeti zaključak o izraženosti VEGF-A u posteljicama kod trudnoća u zastoju rasta.

I.7 Spolne razlike u funkciji posteljice

Makroskopskim pregledom posteljice nakon porođaja ne mogu se ustvrditi postoje li razlike između muškog i ženskog spola. No te razlike postoje na kliničkoj i mikroskopskoj

razini te se one u novije vrijeme sve više uzimaju u obzir kada je riječ o istraživanjima fetalne i posteljice patologije i posljedica koje one uzrokuju.

Dostupnost nutrijenata važna je za normalan rast fetusa, ali i same posteljice. Muški fetusi brže rastu, prosječno imaju veću masu tijekom normalne trudnoće, neovisno o masi posteljice, u odnosu na ženske fetuse. Zbog toga oni zahtijevaju mnogo nutrijenata, ali su i osjetljiviji na njihov manjak pa u slučaju deficita posljedično imaju veći rizik za prijevremeni porođaj, razvoj neonatalnih komplikacija ili intrauterinu smrt (43,44), a u odrasloj dobi za razvoj kronične bubrežne bolesti (28).

Važan je podatak da posteljica ima sposobnost kompenzacije fetalnog stresa ovisno o spolu djeteta. Utvrđeno je da aktivnost 11 beta hidroksteroid dehidrogenaza tip 2 (11 β -HSD-2 od eng. *11 beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2*) ovisi o spolu fetusa. To je enzim odgovoran za metaboliziranje i inaktiviranje kortizola čij je genski obrazac metiliranja povećan u posteljicama sa zastojem u rastu (45). Metilirana DNA se smanjeno prepisuje, a to upućuje da je aktivnost tog enzima smanjena, te da je fetus izložen prekomjernom utjecaju glukokortikoida, odnosno intrauterinom stresu. Dokazano je da je aktivnost 11 β -HSD-2 veća u ženskih fetusa (46), zbog čega muški i ženski fetusi različito reagiraju na stres, a to osim o spolu ovisi i o vremenu nastanka stresa tijekom trudnoće, o čemu će više riječi biti kasnije (47). Zbog stresnih događaja u trudnoći djeca su ovisno o spolu podložna različitim bolestima. Istraživanja na životinjskim modelima pokazala su da muško potomstvo razvija preosjetljivost na neurotransmitere u mozgu (48), a translacijska istraživanja dokazala da ih to čini podložnijima i izlaže većem riziku razvoja depresije, shizofrenije i poremećaja pozornosti s hiperaktivnoću (ADHD od eng. *attention deficit hyperactivity disorder*), odnosno ADHD sindroma (49).

Analiza gena, koja u novije vrijeme dobiva sve veću ulogu u dijagnozi različitih bolesti i čak omogućuje razmatranje terapijskih postupaka koji djeluju na genom, pokazala se kao korisna metoda u traženju spolnih razlika u funkciji posteljice. U stanicama korionskih resica normalnih ljudskih posteljica u kasnom prvom tromjesečju otkriveno je da postoji znatna razlika u izraženosti gena ovisno o spolu fetusa. Pokazano je da postoji različita izraženost 58 gena, od kojih je 35 jače izraženo u ženskih, a 23 u muških posteljica. Daljnjom analizom utvrđeno je da većina gena, njih 40, jesu geni na spolnim kromosomima (50). Kod ženskih fetusa jače su izraženi humani korionski gonadotropin i različiti autosomni geni, dok su kod muških fetusa jače izraženi geni odgovorni za odbacivanje presatka i razvoj bolesti presatka protiv primatelja, zatim za IGF receptor te *GLUT1* (48).

Majčini poremećaji i bolesti mogu dovesti do poremećaja posteljice koji se odražavaju na fetus. Nepravilna prehrana sa smanjenim unosom proteina i većim unosom masti uzrokuju prekomjernu masu fetusa, a posljedično tome makrosomno dijete; astma, pušenje, stres sa povećanim kortizolom u majčinoj krvi i utjecaji iz okoline znatno remete izraženost različitih gena i proteina u posteljici, ovisno o spolu. Prilagodba fetusa na majčinu astmu ovisi o njegovom spolu: ako dođe do egzacerbacije astme u ranoj trudnoći, muški fetusi dalje normalno nastavljaju rasti bez ikakvih promjena koje bi se klinički mogle opaziti, dok ženski reduciraju svoju masu i time sprečavaju svoje oštećenje ako se egzacerbacija ponovi kasnije u trudnoći (43). U podlozi te kompenzacije leže različite promjene koje su izražene na razini gena i proupalnih citokina (51). Pretilost tijekom trudnoće utječe na veličinu fetusa i posteljice, koja je povećana, a zbog toga podložna različitoj patologiji. Analizama posteljica pretilih trudnica zapazilo se da su kronični vilitis i fetalna tromboza dijagnoze koje se češće nalaze u posteljicama iz trudnoća sa ženskim fetusima (52). Svi uzroci koji remete funkcioniranje posteljice potiču odgovor fetusa koji u međudjelovanju mijenja njezin obrazac funkcioniranja i u konačnici dovodi do promjena koje se mogu istražiti na molekularnoj razini analizom posteljice ili klinički opaziti tijekom trudnoće (53).

I.8 Uloga VEGF-A u liječenju zastoja u rastu

Do danas nije pronađen ni jedan lijek kojim bi se mogao liječiti zastoj u rastu. Jedini terapijski pristup je elektivni porođaj nakon otkrivanja hemodinamskih poremećaja u fetusa sa zastojem u rastu, a on nosi svoje rizike za dijete (54). Kako se znanje o funkciji i ulozi čimbenika rasta i signalnih molekula u posteljici povećavalo, tako su istraživanja pokušavala osmisliti terapijski pristup u trudnoćama kompliciranim IUGR-om. Dosadašnja istraživanja na ljudima ispitivala su različite i često korištene lijekove (55), dok novija istraživanja primjenjuju gensku terapiju, ali su provedena samo na životinjskim modelima. Kod primjene genske terapije u središtu pozornosti našao se VEGF-A čija je uloga u funkciji posteljice objašnjena u prijašnjim odjeljcima. Tako su Carr i suradnici pokazali da genska terapija VEGF-om utječe na promjene koje su nastale kao posljedica fetalnog zastoja u rastu (56). Oni su posredno pokušali liječiti fetalni zastoj rasta, primjenjujući VEGF-A, u uterine arterije majke. Tom intervencijom postigli su povećanje brzine rasta fetusa i povećanje porođajne mase ploda. Nadalje, ti rezultati su novijeg datuma, a pokazuju da bi terapijska primjena VEGF-A mogla imati potencijalno korisne učinke na fetalni rast u slučaju njegova zastoja. Razvoj i funkcioniranje posteljice bitno ovise o signalnim molekulama, od kojih VEGF-A ima veliko značenje, pogotovo kod zastoja u

rastu fetusa. Stoga bi istraživanje izraženosti VEGF-A između normalnih posteljica i onih iz zastoja u rastu pružilo bolji uvid u promjene koje se zbivaju s ovim čimbenikom rasta u takvim trudnoćama, što je izuzetno bitno s obzirom na potencijal VEGF-A u liječenju trudnoća s IUGR-om. Također bi bili dragocjeni podaci o izraženosti VEGF-A u odnosu na spol fetusa.

I.9 Hipoteza i ciljevi

VEGF je odgovoran za stvaranje krvnih žila posteljice, a njihovo je stvaranje poremećeno kod fetalnog zastoja u rastu. Pretpostavka je da postoji razlika u izraženosti VEGF-A u posteljicama između normalnih trudnoća i trudnoća sa zastojem u rastu, štoviše, da ta razlika postoji ovisno o spolu djeteta. Ciljevi istraživanja su:

1. Utvrditi postoje li razlike u fetalnoj masi, masi posteljice i njihovom omjeru, te gestacijskoj dobi između normalnih trudnoća i trudnoća sa zastojem u rastu;
2. Odrediti postoji li razlika u izraženosti VEGF-A u posteljicama iz normalnih trudnoća i trudnoća sa zastojem u rastu;
3. Odrediti da li te razlike postoje ovisno o spolu djeteta.

II. Materijali i metode

U istraživanje su bile uključene 32 trudnice. Od toga 16 trudnica urednog tijeka jednoplodne trudnoće te 16 kod kojih je postavljena sumnja na intrauterini zastoj rasta uzrokovan posteljničnom insuficijencijom. Gestacijska dob kod svih trudnica je potvrđena ultrazvučnim pregledom prije 12. tjedna trudnoće. IUGR je bio definiran pomoću ultrazvučnog mjerenja kao fetalna masa ispod 10. percentile (57). Trudnoće sa kromosomskim anomalijama, fetalnim malformacijskim sindromom i znakovima infekcije majke ili fetusa kao i višeplodne trudnoće bile su isključene iz ovog istraživanja. Žene sa prekonceptijskim kroničnim bolestima, ostalim bolestima tijekom trudnoće ili ovisnostima (alkoholizam, ovisnost o drogama i pušenje) također su isključene iz istraživanja.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva i Povjerenstva za lijekove Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te od strane Etičkih povjerenstava suradnih ustanova (KBC Sestre milosrdnice i KB Sveti Duh), uz suglasnost i nakon potpisivanja informiranog pristanka trudnica.

Ultrazvučno snimanje vršilo se pomoću ultrazvučnog uređaja sa kolor Dopplerom i transabdominalnom sondom frekvencije 2-6 MHz i maksimalnom izlaznom energijom uređaja ispod dopuštene razine za korištenje u fetalnoj medicini (58).

Tkiva posteljice su fiksirana u 4%-om paraformaldehidu u fosfatnom puferu (PBS od eng. *Phosphate Buffer Saline*) te ugrađena u parafinski vosak, serijski izrezana na odsječke (rezove) debljine 7 μm u poprečnoj ravnini te stavljena na predmetno stakalce. Konzerviranje tkiva učinjeno je bojanjem svakog 10-og odsječka (reza) hematoksilnom i eozinom. Odsječci su osušeni tijekom noći, deparafinizirani i procesirani koristeći konvencionalne metode. Primarna protutijela koja su korištena bila su anti-VEGF-A protutijela (ab46154, R Chemicon, Temecula, CA, USA). U svrhu blokiranja aktivnosti endogene peroksidaze, rezovi su inkubirani 10 minuta u 0.3%-om H_2O_2 i isprani PBS-om. Otkrivanje antigenskih mjesta vršilo se u mikrovalnoj komorici sa puferom natrijeva citrata (pH 6.0) tijekom 12 minuta. Rezovi su inkubirani s anti-VEGF protutijelom tijekom 1 sata. Nakon ispiranja s PBS-om, rezovi su inkubirani s „Alexa flour 488 donkey anti-rabbit“ protutijelima (1:300, A-11058, Invitrogen Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA) tijekom 1 sata. Nakon inkubacije i završnog ispiranja s PBS-om rezovi su bojani sa DAPI-om (4'6-diamidin-2-fenilindol) da bi se prikazale jezgre, osušeni na zraku, na njih stavljena pokrovna stakalca (*Immuno-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, USA*) i pregledana pomoću Olympus BX61 mikroskopa. Pozitivne kontrole bile su krvne

žile iz tkiva srca za koje se zna da se boje specifično sa primarnim protutijelom. Kao negative kontrole, primarna protutijela su izostavljena. Intenzitet boje struktura posteljice bio je semikvantitavno podijeljen u 4 kategorije ovisno o reaktivnosti bojanja: “-“ označavajući odsutnost reaktivnosti; “+“ blaga reaktivnost; “++“ umjerena reaktivnost; “+++“ jaka reaktivnost. Dva istraživača analizirala su bojenja, uzevši pri tome u obzir varijacije među njima.

U istraživanju je promatran odnos mjerenih varijabli -gestacijske dobi, porođajne mase, mase posteljice; izračunate varijable - fetoplacentarni omjer (FPR od eng. *fetoplacental ratio*) dobiven omjerom porođajne mase i mase posteljice; te kategorička varijabla -izraženost VEGF-A između normalnih trudnoća (kontrole) i trudnoća sa IUGR-om te između spolova. Statističke metode korištene za usporedbu numeričkih varijabli su Studentov t-test za dvije grupe i analiza varijance za više grupa te Tukeyev post-hoc test za međusobnu analizu između grupa. Za usporedbu kategoričkih varijabli korištene su neparametrijski Mann-Whitney-ev test za dvije grupe i Kruskal-Wallisov test za više grupa. P vrijednost $< 0,05$ smatrala se statistički značajnom. Analiza je izvršena u računalnom programu *Statistica*.

III. Rezultati

Deskriptivna statistika praćenih parametara navedena je u Tablicama 1. i 2., a VEGF-a u Tablici 3.

VEGF-A je bio izražen u endotelu fetalnih krvni žila, vezivu korionskih resica i sinciotrofoblastu. Izraženost VEGF-a u kontrolnoj skupini bila je većinom blaga, dok je u IUGR skupini ona umjerena do jaka (Tablica 3.) te se ona značajno razlikovala među njima ($p=0,005$). Usporedbom praćenih varijabli između kontrolne i IUGR skupine (Tablica 4.), razlikovala se porođajna masa ($p<0,001$), masa posteljice ($p<0,001$) i gestacijska dob ($p<0,001$). Gotovo sva djeca rođena su u terminu, stoga iako postoje razlike u gestacijskoj dobi, one mogu biti zanemarene.

Tablica 1. Deskriptivna statistika kontrole

\bar{x} -aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; Q1-donja kvartila; Q3-gornja kvartila; FPR-fetoplacentarni omjer

Varijabla	N	\bar{x}	SD	Min	Q1	Medijan	Q3	Max
Gestacijska dob (dani)	16	277,56	6,387	266,00	273,00	277,50	283,00	288,00
Porođajna masa (g)	16	3577,50	290,941	3040,00	3345,00	3525,00	3860,00	3990,00
Masa posteljice (g)	16	463,13	62,179	360,00	420,00	452,50	485,00	595,00
FPR	16	7,81	0,905	6,58	7,07	7,79	8,36	9,25

Tablica 2. Deskriptivna statistika IUGR.

IUGR-intrauterini zastoje u rastu; \bar{x} -aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; Q1-donja kvartila; Q3-gornja kvartila; FPR-fetoplacentarni omjer

Varijabla	N	\bar{x}	SD	Min	Q1	Medijan	Q3	Max
Gestacijska dob (dani)	16	263,63	10,138	241,00	259,50	264,00	272,50	278,00
Porođajna masa (g)	16	2167,50	321,776	1450,00	1950,00	2265,00	2400,00	2620,00
Masa posteljice (g)	16	303,00	51,722	209,00	255,00	310,00	327,50	390,00
FPR	16	7,23	0,984	6,03	6,45	7,10	7,66	9,60

Tablica 3. Deskriptivna statistika i usporedba izraženosti VEGF-A između kontrolne i IUGR skupine.

VEGF-vaskularni endotelni čimbenik rasta; IUGR-intrauterini zastoj u rastu

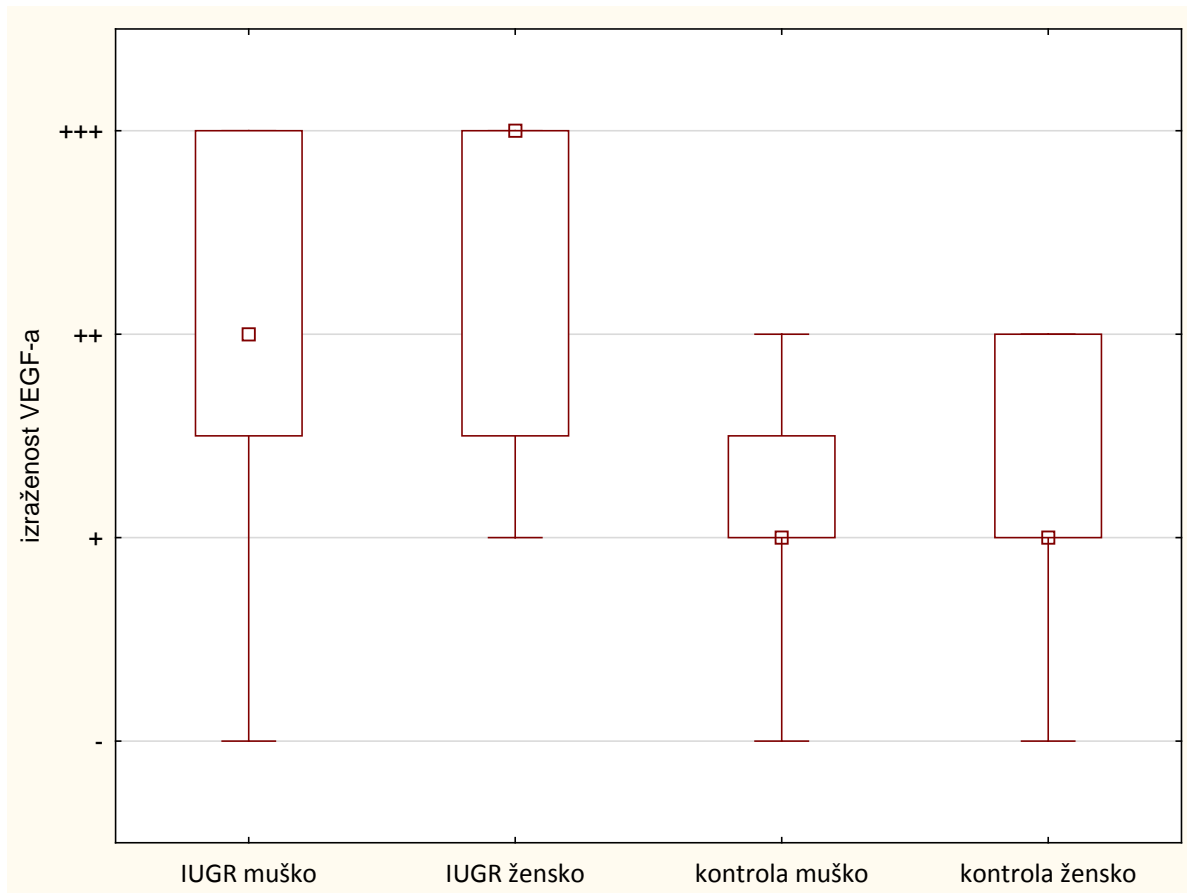
Kategorija	Kontrola (n=16)		IUGR (n=16)		P vrijednost
	Broj	Udio (%)	Broj	Udio (%)	
Odusnost reaktivnosti (-)	2	12,50	1	6,25	0,005
Blaga reaktivnost (+)	9	56,25	3	18,75	
Umjerena reaktivnost (++)	5	31,25	4	25,00	
Jaka reaktivnost (+++)	0	0,00	8	50,00	

Tablica 4. Usporedba kontrolne i IUGR skupine.

IUGR-intrauterini zastoj u rastu; \bar{x} -aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; FPR-fetoplacentarni omjer

Varijabla	Kontrola (n=16)		IUGR (n=16)		P vrijednost
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
Gestacijska dob (dani)	277,56	6,387	263,63	10,138	<0,001
Porodajna masa (g)	3577,50	290,941	2167,50	321,776	<0,001
Masa posteljice (g)	463,13	62,179	303,00	51,722	<0,001
FPR	7,81	0,905	7,23	0,984	0,09

Stratifikacijom kontrolne i IUGR skupine po spolu i usporedbom izraženosti VEGF-A, između njih nije pronađena statistički značajna razlika ($p=1,000$ u kontrolnoj i $p=1,000$ u IUGR skupini). Grafički prikaz izraženosti VEGF-A po spolu prikazan je na Slici 1.



Slika 1. Box-and whisker prikaz izraženosti VEGF-A ovisno o spolu. Točke označavaju medijane, pravokutnici interkvartilni raspon, a tanke vertikalne crte ukupan raspon vrijednosti.

VEGF-vaskularni endotelni čimbenik rasta; IUGR-intrauterini zastoje u rastu

Podjelom po spolu u četiri podskupine analiza varijance pokazala je da postoje značajne razlike među njima (Tablica 5.) u porođajnoj masi ($p < 0,001$), masi posteljice ($p < 0,001$) te u gestacijskoj dobi ($p = 0,001$). Daljnja analiza utvrdila je da se ni jedan od mjerenih parametara ne razlikuje po spolu unutar kontrolne i unutar IUGR skupine, ali se po spolu razlikuju između njih (Tablica 6.).

Tablica 5. Usporedba praćenih varijabli po spolu između kontrolne i IUGR skupine.

IUGR-intrauterini zastoj u rastu; \bar{x} - aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; FPR-fetoplacentarni omjer; F-F vrijednost analize varijance

Varijabla	Kontrola (n=16)				IUGR (n=16)				F(3,28)	P vrijednost
	Muški (n=8)		Ženski (n=8)		Muški (n=8)		Ženski (n=8)			
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD		
Gestacijska dob (dani)	276,75	6,585	278,38	6,523	266,63	6,368	260,63	12,614	7,977	0,001
Porođajna masa (g)	3575,00	225,832	3580,00	361,070	2240,00	294,521	2095,00	350,876	54,492	<0,001
Masa posteljice (g)	469,38	57,348	456,88	70,048	293,75	41,812	312,25	61,553	20,109	<0,001
FPR	7,70	0,898	7,93	0,957	7,70	1,106	6,76	0,590	2,601	0,071

Tablica 6. P vrijednosti Tukeyevog post-hoc testa praćenih varijabli. Razlika je značajna kad je $p < 0,05$.

IUGR- intrauterini zastoje u rastu

Varijable	Kontrola (n=16)		IUGR (n=16)	
	Muški (n=8)	Ženski (n=8)	Muški (n=8)	Ženski (n=8)
Gestacijska dob				
Kontrola muški		0,980	0,101	0,004
Kontrola ženski	0,980		0,045	0,001
IUGR muški	0,101	0,045		0,498
IUGR ženski	0,004	0,001	0,498	
Porodajna masa				
Kontrola muški		1,000	< 0,001	< 0,001
Kontrola ženski	1,000		< 0,001	< 0,001
IUGR muški	< 0,001	< 0,001		0,791
IUGR ženski	< 0,001	< 0,001	0,791	
Masa posteljice				
Kontrola muški		0,973	< 0,001	< 0,001
Kontrola ženski	0,973		< 0,001	< 0,001
IUGR muški	< 0,001	< 0,001		0,921
IUGR ženski	< 0,001	< 0,001	0,921	

IV. Rasprava

Ovo istraživanje pokazalo je da postoji razlika u izraženosti VEGF-A u posteljici, porođajnoj masi, masi posteljice i gestacijskoj dobi između djece rođene iz normalne trudnoće i trudnoće komplicirane zastojem u rastu, dok ta razlika ne postoji u FPR-u. Štoviše pokazalo je da se svi ti parametri, osim izraženosti VEGF-A, razlikuju po spolu, ali između kontrolne i IUGR skupine, no ne i unutar njih.

Izraženost VEGF-A statistički se značajno razlikovala između kontrolne i IUGR skupine ($p=0,005$; Tablica 3.). Povećana izraženost VEGF-A u posteljicama sa zastojem u rastu govori u prilog da ona stvara nove krvne žile usprkos tome što postoji njezina disfunkcija. Međutim, Mayhew i suradnici pokazali su da je vaskularizacija poremećena i nije funkcionalna kao u normalnim posteljicama (59). Rezultati ostalih istraživanja imali su drugačije zaključke. U životinjskim modelima sa zastojem u rastu, čiji bi se rezultati mogli translirati na ljude, pokazano je da nema povećane izraženosti posteljičnog VEGF-A (39). U istom istraživanju mjerila se i izraženost PIGF-a koje je bila povećana, a istraživačima je taj međuodnos čimbenika rasta bio dovoljan da nađu objašnjenje kako se fetus i posteljica uopće ne nalaze u hipoksiji. Isti istraživači na istim životinjskim modelima ranije su pokazali da je izraženost VEGF-A u posteljici povećana (60). U ovom slučaju objašnjenje za povećanu izraženost VEGF-a pronašli su u činjenici da su mjerenje obavili u određenom vremenskom trenutku tijekom trudnoće (nisu čekali porođaj pa onda analizirali posteljice), te da je ta povećana izraženost samo kratkotrajna i da se razine VEGF-A vraćaju na normalne vrijednosti s daljnjim napredovanjem trudnoće. Ovakvi oprečni rezultati mogu se objasniti različitim dizajnom studija i time što su istraživači umjetno izazivali nastanak zastoja u rastu te potom istraživali moguće ishode. Istraživanja na ljudima su jednoznačnija i došla su do istih rezultata kao i ovo istraživanje. Jedno istraživanje na većem uzorku posteljica uspjelo je dokazati da se izraženost VEGF-A razlikuje između normalnih posteljica i onih kompliciranih zastojem u rastu (42). U ovom slučaju postojala je razlika između genske izraženosti koja je bila povećana kod zastoja u rastu. Drugo istraživanje došlo je do istih zaključaka, samo što je ono uspoređivalo količinu proteina VEGF-A (61). To istraživanje koristilo je isti sustav bodovanja izraženosti VEGF-A u posteljici, kao i ovo istraživanje (Tablica 3.) te je provedeno na malo većem uzorku, ali je pokazalo da su sve posteljice iz normalne trudnoće imale blagu izraženost (+), dok su sve iz trudnoća sa zastojem u rastu imale jaku izraženost (+++). Uspoređujući te podatke s podacima iz ovog istraživanja možemo zaključiti da postoji varijabilna izraženost VEGF-A u posteljici ovisno o trudnoći sa ili bez zastoja u rastu, te da njegova izraženost individualno varira, ali je

sveukupno značajno povećana u fetalnom zastoju rasta. No, rezultati analize po spolu pokazuju drugačije rezultate.

Izraženost se VEGF-A nije razlikovala između kontrolne i IUGR skupine po spolu, kao niti unutar skupina. Izraženost VEGF-A kod kontrolnih i IUGR skupina pokazana je na Slici 1. Analizirajući je može se zaključiti da je raspon izraženosti VEGF-A kod obje skupine velik, a da je najizraženiji kod grupe IUGR muško. Kod tih posteljica reaktivnost VEGF-A bila je u rasponu od odsutne pa sve do jake, no najviše je ipak bila umjerena (medijan je ++). Uspoređujući tu izraženost sa grupom IUGR žensko, vidi se da je raspon reaktivnosti VEGF-A sličan, ali da je u toj skupini ipak izraženiji (medijan je +++). Na temelju ovih grafičkih i brojčanih vrijednosti (nisu prikazane) može se zaključiti da nema razlike između izraženosti VEGF-A između ove dvije grupe ($p=0,001$). Kod kontrolne skupine izraženost po spolu bila je relativno slična (medijan je + odnosno slaba izraženost), a statistička obrada i grafički prikaz pokazuju da među njima također nema razlike u izraženosti VEGF-A ($p=0,001$). Proučavajući Sliku 1. moglo bi se pretpostaviti da postoje razlike po spolu između istih spolova u kontrolnoj i IUGR skupini, no analizom podataka pokazalo se da one ne postoje (za muške fetuse $p=0,432$, a za ženske $p=0,179$), ali kod interpretacije ovih rezultata u obzir se mora uzeti i veličina uzorka u ovom istraživanju. Na temelju dobivenih rezultata može se postaviti pitanje je li ženska posteljica bolje kompenzira insuficijenciju od muške i je li zbog toga neonatalni ishod ženske djece bolji? Dosadašnja istraživanja nisu uspoređivala izraženost VEGF-A po spolu ni u normalnim posteljicama, niti u onima koje su iz trudnoća sa zastojem u rastu, te je ovo prvo istraživanje koje se bavilo tom problematikom. Dakle, potrebna su dodatna istraživanja koja će točnije odgovoriti ima li razlike u izraženost VEGF-A po spolu. VEGF-A je molekula koja ima vrlo veliku važnost u nastanku posteljice, a njegova promijenjena izraženost može biti pokazatelj zbivanja koja se događaju intrauterino što može otvoriti put mogućoj intervenciji kako bi se trudnoća dovela do kraja, a fetus razvio normalno. Male promjene VEGF-A imaju velike učinke na rast fetusa, a u konačnici i na porođajnu masu djeteta.

Porođajna masa statistički se značajno razlikovala između kontrolne i IUGR skupine (3577,50 g i 2167,50 g; $p<0,001$; Tablica 4.). Sam zastoj u rastu u prvome redu podrazumijeva smanjenje fetalnih organa, čij se rast može ultrazvučno pratiti tijekom trudnoće, a u konačnici i smanjenje porođajne mase. Usporedbom kontrolne i IUGR skupine u ovom istraživanju pokazali smo da je porođajna masa djece rođene sa zastojem rasta statistički značajno manja od djece rođene iz normalnih trudnoća. Relativnom usporedbom porođajne mase može se vidjeti da je ona u kontrolnoj skupini za 65% veća nego u IUGR skupini. Istraživanja su pokazala da

je oko 70% djece rođene u terminu, a porođajne mase ispod 10. percentile za gestacijsku dob, zapravo zdravo jer su dosegili svoj genetski predodređeni potencijal rasta, ali su mala za gestacijsku dob i neuhranjena. Ostalih 30% su djeca sa zastojem u rastu koji nosi daljnji rizik za poremećaje u životu (62). Tako niska porođajna masa djece s intrauterinim zastojem u rastu odražava se na sve organe te time smanjuje njihove funkcijske rezerve i utječe na njihov postnatalni razvoj koji je poremećen. U skladu s time, istraživanja su pokazala da djeca rođena sa zastojem u rastu imaju sklonost različitim poremećajima u postnatalnom periodu, a to se odražava na odraslu dob. Tako je pokazano da fetusi koje zahvaća ovaj poremećaj imaju manju porođajnu masu i veći rizik za prijevremeni porođaj (63), poremećen razvoj mozga (64), hipertrofiju desnog ventrikula (65), sniženu razinu različitih signalnih molekula i transkripcijskih faktora u fetalnim bubrezima (66), kao i sniženu razinu glukoze i inzulina u fetalnom krvotoku (67). Mozak je zadnji organ koji je zahvaćen zastojem u rastu, ali kada do toga dođe, onda ostavlja dugoročne posljedice. Njegov ukupni volumen, volumen sive tvari i broj stanica u mozgu, smanjeni su, a za posljedicu djeca imaju slabije razvijen kapacitet pažnje u prvih nekoliko mjeseci života. Smanjena povezanost između korteksa i bazalnih ganglija rezultira hiperaktivnošću, kognitivnim i psihološkim poteškoćama u periodu osnovne škole djeteta, a to kao posljedicu ima niža obrazovna postignuća (30,31). Prospektivna studija koja je devet godina pratila djecu sa zastojem u rastu pokazala je kako ona mogu imati snižen kvocijent inteligencije, smetnje pažnje, poteškoće u učenju i pamćenju, vizuomotoričkoj organizaciji te govornim vještinama (29). No, osim mozga i posljedičnih neurorazvojnih poremećaja, kardiovaskularni sustav također je zahvaćen, a posljedice koje se mogu očitovati u njegovom funkcioniranju su hipertenzija koja se javlja u mladenačkoj dobi i povišen kolesterol koji je rizik za druge kardiovaskularne bolesti. Osim toga, sa hipertenzijom je povezan i bubrežni sustav kojemu je funkcijska rezerva smanjena, odnosno broj nefrona reduciran i zbog njihove hiperfunkcije oni prestanu djelovati, a time se razvija kronična bubrežna bolest i naposljetku zatajenje bubrega (28). Prvu hipotezu da poremećen fetalni razvoj može dovesti do bolesti u odrasloj dobi postavio je engleski epidemiolog David Barker 1986. godine, a danas je ona pod nazivom „*Hipoteza o fetalnom podrijetlu bolesti*“ brojnim istraživanjima potvrđena, a gore navedeni primjeri su neki od dokaza koji je također potvrđuju (68).

Nadalje, uzimajući u obzir spol djeteta, porođajna masa razlikovala se između kontrolne i IUGR skupine, no te razlike nije bilo unutar skupine (Tablica 5. i 6.). U normalnim donešenim trudnoćama, ženska novorođenčad imaju u prosjeku manju porođajnu masu nego muška. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazali su da nema razlike među spolovima u normalnim trudnoćama. U obzir se mora uzeti veličina uzorka koji je mali i na temelju njega

ne mogu se donositi zaključci koji će vrijediti za opću populaciju. Uspoređujući mušku novorođenčad između kontrolne i IUGR skupine, pokazalo se da postoji razlika među njima. Isti takav rezultat pokazala je usporedba ženske novorođenčadi između kontrolne i IUGR skupine. Dosadašnja istraživanja utvrdila su da je niska porođajna masa povezana s različitim poremećajima u odrasloj dobi, a da rizici za nastajanje tih poremećaja ovise o spolu fetusa. Više istraživanja potvrdilo je da su muška novorođenčad s niskom porođajnom masom sklonija hipertenziji u odrasloj dobi (28). Istraživanja na životinjskim modelima sa zastojem u rastu pokazala su iste rezultate kod muškog potomstva tako što su pronašla promjene u bubrežnom renin-angiotenzin-aldosteronskom sustavu (69). Paralelno s tim otkrićima drugi istraživači pokazali su da oksidativni stres u bubrezima također igra ulogu u nastanku hipertenzije u odrasloj dobi. Štoviše, pokazali su da se markeri oksidativnog stresa u bubrezima razlikuju kod muških i ženskih osoba, odnosno da su kod muških povećani, a da su kod ženskih osoba jače izraženi antioksidansi (70). Ovi podaci govore da postoji uzročno-posljedični slijed koji započinje u intrauterinom razdoblju kod zastoja u rastu te se očituje tek u odrasloj dobi. Ženski fetusi su otporniji na nastanak ovakvih promjena, vjerojatno zbog drukčijeg načina prilagodbe u intrauterinom razdoblju. Mehanizmi koji održavaju tlak normalnim u intrauterinom periodu prilagođavaju se novostvorenoj situaciji insuficijencije posteljice koja izaziva fetalnu hipoksiju te dolazi do promjene u njihovom funkcioniranju. Tako nastale promjene zadržavaju se i nakon porođaja, ali ne moraju nužno biti prisutne u ranim fazama života, nego se mogu pojaviti čak nekoliko desetaka godina kasnije. No važno je još napomenuti da se kod analize ovakvih poremećaja sve više uzima u obzir vrijeme nastanka zastoja u rastu i na temelju toga donose zaključci, što znači da će novija istraživanja možda pokazati drukčije rezultate (71). Sve gore nabrojane promjene ovise o porođajnoj masi, a ona ovisi o normalnom funkcioniranju posteljice, ali i o njenoj masi koja omogućuje dovoljan transport hranjivih tvari.

Masa posteljice statistički se značajno razlikovala između kontrolne i IUGR skupine (463,13 g i 303 g; $p < 0,001$; Tablica 4.). Posteljica je neophodan organ za rast fetusa zbog toga što se preko nje odvija sav transport i komunikacija između fetusa i majke, odnosno vanjskog svijeta. Ona je selektivna i služi kao barijera i zaštita fetusa od štetnih molekula. Više istraživanja došlo je do istog zaključka i dokazalo kako je masa posteljice u trudnoćama sa zastojem u rastu značajno manja od onih iz normalnih trudnoća (59,72,73). Masa posteljice vrlo je bitan faktor za rast fetusa jer ona određuje kolika će biti njezina veličina, a time i njezina površina. Površina posteljice određuje kolika će biti dodirna ploha između trofoblasta i decidue basalis endometrija, a to je u uskoj svezi sa količinom nutrijenata koji se transportiraju kroz nju. U posteljicama iz normalnih trudnoća mreža krvnih žila razvija se kroz čitavu trudnoću i

stvaranjem terminalnih resica povećava se površina dostupna za izmjenu nutrijenata. Posteljica na taj način omogućuje fetusu da zadovolji svoje povećane potrebe za nutrijentima u trećem tromjesečju, u razdoblju kad on brzo raste. U uvodu je rečeno da je insuficijencija posteljice najvažniji uzrok zastoja u rastu, a u podlozi te patologije je abnormalna placentacija, odnosno nepravilna invazija trofoblasta u endometriju. Zbog toga razvoj posteljičnih krvnih žila ne teče normalno i ukupna površina dostupna za transport se smanjuje (59). Posljedično smanjenoj površini za transport, smanjen je dotok nutrijenata i izmjena plinova te nastaju kompenzacijski mehanizmi u fetusu koji su opisani u uvodu, a njihovom smanjenom učinkovitošću nastupa zastoj u rastu. Korisno je spomenuti da su neka istraživanja povezala izgled posteljice sa hipertenzijom u odrasloj dobi (47). No, uzevši u obzir navedene primjere ovisnosti mase posteljice i dugoročnih promjena u organizmu odrasle osobe, zanimljivo je dodatno provjeriti kakav je međudnos mase posteljica ovisno o spolu.

Masa posteljice, kako je navedeno, razlikovala se između kontrolne i IUGR skupine, no te razlike nije bilo unutar grupa kada se u obzir uzme spol djeteta (Tablica 6.). Muške i ženske posteljice iz kontrolne skupine imale su značajno veću masu od muških i ženskih iz IUGR skupine. Proučavajući dobivene rezultate može se vidjeti da ženske posteljice iz zastoja u rastu imaju veću masu od muških iz zastoja u rastu. Prije je već napomenuto da posteljica raste kroz čitavu trudnoću, ali joj se rast polako usporava u trećem trimestru, dok se masa fetusa u tom periodu brzo povećava. Muški fetusi rastu brže od ženskih, ali su osjetljiviji na manjak nutrijenata i na insuficijenciju posteljice. Ako dođe do stresnog događaja u ranom fetalnom razdoblju, muški fetusi ne će promijeniti svoju brzinu rasta i veličinu posteljice, dok će ženski usporiti svoj rast i time smanjiti zahtjeve za nutrijentima, ali će povećati otpornost na slične stresne događaje kasnije u trudnoći. S druge strane, muški fetusi će nakon opetovanog stresa u kasnijem stadiju trudnoće imati veći rizik za fetalnu smrt i prijevremeno rođenje, kako je navedeno ranije (43), dok će ženski fetusi biti prilagođeni i uspješno prevladati ovakve događaje (47). Masa posteljice ženskih fetusa kod IUGR skupine u ovom istraživanju govori da ona ima dovoljni kapacitet da takav poremećaj, zastoj u rastu, pokuša barem djelomično kompenzirati. No važno je napomenuti da se kod ovakvog tumačenja spominje i efektivnost posteljice koja je kod muških fetusa veća nego kod ženskih, ali ima manju rezervu i time u stanjima stresa ne može nadoknaditi nutrijente koji su potrebni muškom fetusu za rast (74). Zanimljivo je ponovno spomenuti da su istraživači povezali oblik posteljice sa rizikom za nastanak hipertenzije u odrasloj dobi: u muškog spola bio je velik promjer posteljice koja je poprimila kružan oblik, dok je u ženskom spolu mali promjer i mala površina posteljice (74). Sve te promjene u svezi su s masom posteljice, a ona određuje koliku će opskrbu hranjivim tvarima fetus dobivati

tijekom trudnoće, odnosno kolika će u konačnici biti njegova porođajna masa. A parametar koji opisuje taj odnos između porođajne mase i mase posteljice jest FPR.

Fetoplacentarni omjer između kontrolne i IUGR skupine nije se statistički značajno razlikovao (7,81 i 7,23; $p=0,09$; Tablica 4.). Taj pojam označava efikasnost posteljice, odnosno koliku masu fetus dobiva po gramu posteljice. To je relativan pojam koji pokazuje i koliko je posteljica efikasna u prijenosu nutrijenata te njihovom utrošku u stvaranju fetalnog tkiva (75). FPR se povećava s napredovanjem normalne trudnoće jer fetus u trećem trimestru brže povećava svoju masu u odnosu na masu posteljice. Djeca s normalnom porođajnom masom rođena u terminu i relativno niskim FPR-om imaju velike posteljice s malom sposobnošću prijenosa hranjivih tvari. Ako pretpostavimo da je kod njih FPR velik, oni bi trebali imati prekomjernu porođajnu masu. S druge strane, dijete maleno za gestacijsku dob i rođeno u terminu, a s povećanim FPR-om, pokazuje da je njegova posteljica relativno malena, ali da normalno ili čak povećano transportira nutrijente. Ovo istraživanje pokazalo je da je FPR kod zastoja u rastu normalan te da se ne razlikuje od normalnih trudnoća. No, dosadašnja istraživanja smatraju kako je taj omjer kod trudnoća sa zastojem u rastu smanjen, što bi označavalo da se relativno mala posteljica nije uspjela prilagoditi i povećati kapacitet transporta nutrijenata u svrhu kompenzacije usporavanja rasta fetusa s napredovanjem trudnoće (76). FPR služi kao orijentacijska vrijednost koja pokazuje u koju bi skupinu, gledajući masu fetusa, oni mogli biti smješteni: mali, normalni ili veliki za gestacijsku dob. Istraživanja su pokazala da takva klasifikacija ima i dijagnostičku vrijednost jer rubne vrijednosti FPR-a ($<10.$ i $>90.$ percentile za gestacijsku dob) povećavaju rizik za fetalnu smrt (77). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su se posteljice, usprkos tome što je nastao zastoj u rastu i što je njihova masa znatno manja od normalnih, prilagodile novonastaloj situaciji, pojačale svoje preostale transportne kapacitete, efikasnost i trudnoću uspjele dovesti do kraja. Postoji mogućnost da se kod tih fetusa nije razvila hipoksija pa je posteljica još imala mogućnost kompenzacije. Rezultat dobiven u ovom istraživanju je vrijedan te pokazuje da FPR ne mora nužno biti snižen u fetalnom zastoju rasta. Nadalje, analizom FPR-a po spolu dobili su se slični rezultati.

Fetoplacentarni omjer nije se razlikovao po spolu između kontrolne i IUGR skupine (Tablica 5.) Pojedina istraživanja na većem uzorku pokazala su da postoje razlike među spolovima u normalnim trudnoćama, pri čemu je FPR veći u muških (78). To znači da su muške posteljice efikasnije od ženskih i da one bolje koriste nutrijente koji su na raspolaganju kako bi ih iskoristili za rast fetusa. To je u skladu sa činjenicama da normalni muški fetusi rastu brže te da je njihova porođajna masa veća od ženskih (74). Nadalje, jedno istraživanje utvrdilo je da

djeca koja imaju mali FPR imaju veći rizik rođenja sa smanjenom porođajnom masom. Štoviše, ispitalo je da li se taj rezultat može prilagoditi kako bi se koristio u razlikovanju djece sa zastojem u rastu i one koja su mala za gestacijsku dob, no nije u tome uspjelo (79). Nadalje, ovo naše istraživanje nije pokazalo značajne razlike između muških i ženskih posteljica u vidu FPR-a, no zbog malog uzorka ne možemo govoriti o općim zaključcima, ali možemo uzeti ovaj rezultat kao nalaz koji pokazuje da uvijek postoje iznimke koje treba uzimati u obzir kada je riječ o istraživanjima na ljudima.

Nadalje, zadnji mjereni parametar u ovom istraživanju odnosio se na gestacijsku dob. U normalnim trudnoćama, gestacijska dob uz hranjive tvari određuje koliku će masu dijete imati prilikom rođenja. U našem istraživanju gestacijska dob se razlikovala između kontrolne i IUGR skupine (278 i 254 dana; $p < 0,001$; Tablica 4.), no važno je napomenuti da su gotovo sva djeca (osim dvoje) iz obiju skupina rođena između 37. i 42. tjedna (259.-294. dana) trudnoće, dakle u terminu. Razlike koje su pronađene u gestacijskoj dobi i nisu toliko značajne ako uzmemo u obzir da je normalan vremenski okvir u kojemu se očekuje porođaj relativno dug i traje čak 5 tjedana. Srednje vrijednosti gestacijske dobi obiju skupina se nalaze u tom intervalu i pokazuju da su djeca iz obiju skupina rođena u terminu. Razlike koje su se opazile među njima samo govore da su djeca iz IUGR skupine rođena malo ranije, ali opet u normalnom vremenskom okviru kao i ona iz kontrolne skupine te da u obje skupine postoje varijacije u terminu porođaja koje su očekivane i dalje se smatraju normalnima. Stoga razlike u gestacijskoj dobi koje su pronađene među njima ne bi trebale biti od velikog značaja i predstavljati obilježje po kojemu se ove dvije skupine razlikuju. Usporedbom gestacijske dobi po spolu dobiva se sličan rezultat koji se također ne bi trebao uzeti u obzir kao obilježje po kojemu se sve četiri skupine razlikuju, već on odražava različite vrijednosti gestacijske dobi koje se nalaze u normalnom rasponu između 37. i 42. tjedna trudnoće.

Također, gestacijska dob bila je različita između kontrolne i IUGR skupine, no ona se nije opazala unutar skupina po spolu (Tablica 6.). Sve grupe rođene su u terminu te se razlika u danima ne bi trebala uzeti kao značajan nalaz koji će utjecati na ostale rezultate koji su dobiveni. Sve vrijednosti su unutar normalnog raspona za očekivanu terminsku trudnoću i mogu se uzeti kao normalne, neovisno o spolu.

U uvodu je spomenuto da se u novije vrijeme ispituju terapijski pristupi liječenja fetalnog zastoja rasta. Osim genske terapije VEGF-om postoje i drugi pristupi, no oni nisu toliko zastupljeni. Jedan takav pristup koristio je prehranu aminokiselinom citrulinom i pokazao poboljšane FPR u fetalnom zastoju rasta, što upućuje na to da se efikasnost posteljice može

povećati (80). No, rezultat u našem istraživanju pokazuje da se efikasnost posteljice nije uopće mijenjala, a povećana izraženost posteljičnog VEGF-A bi mogla biti razlog zašto se to nije dogodilo. Ovo istraživanje govori da je kompenzacijsko povećanje izraženosti VEGF-A mehanizam koji pokušava vratiti posteljicu u prvobitno stanje ne bi li ona omogućila fetusu normalan rast. Nadalje, iz rezultata koji su dobiveni u ovom istraživanju i usporedbom s gore navedenom genskom terapijom može se zaključiti da povećanje VEGF-A ili nije dovoljno ili da postoji neki drugi mehanizam koji koči njegovo djelovanje, usprkos tome što je on povećano izražen u posteljici. Važno je još ponoviti da su istraživanja pokazala da genska terapija VEGF-om povećava porođajnu masu djece iz trudnoća sa zastojem u rastu (56), što je bitno ako se uzme u obzir da je niska porođajna masa povezana s većim rizikom za različite bolesti u odrasloj dobi, kako je već navedeno (28,29). Prema našim rezultatima, izraženost posteljičnog VEGF-A, iako ne statistički značajno, nešto je veća u ženskih fetusa iz trudnoća sa IUGR-om, kao i masa posteljice. Pošto je ovo prvo istraživanje koje je uspoređivalo izraženost VEGF-A po spolu u posteljici, potrebna su dodatna istraživanja na većem uzorku da bi se točno utvrdilo je li ta razlika stvarno postoji i je li u genskoj terapiji treba uzeti u obzir te razlike.

V. Zaključak

Ovo istraživanje pokazuje da postoji razlika u izraženosti VEGF-A u posteljicama između normalnih trudnoća i trudnoća kompliciranih IUGR-om. Ta razlika također postoji u porođajnoj masi, masi posteljice i gestacijskoj dobi. Podjelom posteljica po spolu nije se opazila značajna razlika u izraženosti VEGF-A, ni u kontrolnoj niti u IUGR skupini, premda je češće povećana u IUGR skupini, posebice u ženskim posteljicama. Značajna razlika među spolovima pronađena je u porođajnoj masi, masi posteljice i gestacijskoj dobi.

VI. Zahvale

Zahvaljujem se mentorici, prof.dr.sc. Aidi Salihagić Kadić na uputama i pomoći pri traženju literature, savjetima i trudu oko pisanja rada te na mogućnosti da sudjelujem u njenim projektima.

Zahvaljujem se Maji Grah, dr.med., na pomoći pri traženju literature, ustupanju i prikupljanju podataka, objašnjenjima detalja, te na velikom trudu, uputama i iscrpnim savjetima koji su mi uvelike pomogli pri pisanju ovog rada.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Slavici Sović, na savjetima i pomoći oko statističkih obrada podataka.

Zahvaljujem se ostalim članovima povjerenstva za diplomske radove što su odvojili vrijeme za čitanje i kritičko ocjenjivanje ovog rada.

VII. Literatura

1. Sadler T. Langman's Medical Embryology. Twelfth Edition. Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins. 2012;29–107.
2. 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 Sep;92(1):35–43.
3. Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jun;87(6):2954–9.
4. Handwerger S, Freemark M. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000 Apr;13(4):343–56.
5. Forbes K, Westwood M. Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth. *J Endocrinol.* 2010 Oct;207(1):1–16.
6. Wrighton KH, Lin X, Feng X-H. Phospho-control of TGF-beta superfamily signaling. *Cell Res.* 2009 Jan;19(1):8–20.
7. Forbes K, Westwood M. The IGF axis and placental function. A mini review. *Horm Res.* 2008;69(3):129–37.
8. Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, et al. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature.* 1995 Jul 27;376(6538):337–41.
9. Baczyk D, Dunk C, Huppertz B, Maxwell C, Reister F, Giannoulas D, et al. Bi-potential behaviour of cytotrophoblasts in first trimester chorionic villi. *Placenta.* 2006;27(4–5):367–74.
10. Parikh AA, Ellis LM. The vascular endothelial growth factor family and its receptors. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2004;18(5):951–71.
11. Hoeben A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004 Dec 1;56(4):549–80.
12. De Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp Mol Med.* 2012 Jan 31;44(1):1–9.
13. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR)

- Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*. 2011 Dec;2(12):1097–105.
14. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):242–8.
 15. Zygmunt M, Herr F, Münstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003 Sep 22;110 Suppl:S10-8.
 16. Huppertz B, Peeters LLH. Vascular biology in implantation and placentation. *Angiogenesis*. 2005;8(2):157–67.
 17. Arroyo JA, Winn VD. Vasculogenesis and Angiogenesis in the IUGR Placenta. *Semin Perinatol*. 2008;32(3):172–7.
 18. Breier G. Angiogenesis in embryonic development--a review. *Placenta*. 2000;21 Suppl A(SUPPL.1):S11-5.
 19. Kumazaki K, Nakayama M, Suehara N, Wada Y. Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. *Hum Pathol*. 2002 Nov;33(11):1069–77.
 20. Giraudo E, Primo L, Audero E, Gerber HP, Koolwijk P, Soker S, et al. Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1998 Aug 21;273(34):22128–35.
 21. Enholm B, Paavonen K, Ristimäki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, et al. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene*. 1997 May 22;14(20):2475–83.
 22. Ristimäki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem*. 1998 Apr 3;273(14):8413–8.
 23. Akagi Y, Liu W, Zebrowski B, Xie K, Ellis LM. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor-I. *Cancer Res*. 1998 Sep 1;58(17):4008–14.
 24. Hyder SM, Stancel GM, Chiappetta C, Murthy L, Boettger-Tong HL, Makela S. Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifen. *Cancer Res*. 1996 Sep 1;56(17):3954–60.

25. Ruohola JK, Valve EM, Karkkainen MJ, Joukov V, Alitalo K, Härkönen PL. Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1999 Mar 25;149(1–2):29–40.
26. Baschat AA, Hecher K. Fetal Growth Restriction due to Placental Disease. *Semin Perinatol*. 2004;28(1):67–80.
27. Serena C, Marchetti G, Rambaldi MP, Ottanelli S, Di Tommaso M, Avagliano L, et al. Stillbirth and fetal growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013 Jan;26(1):16–20.
28. Intapad S, Ojeda NB, Dasinger JH, Alexander BT. Sex Differences in the Developmental Origins of Cardiovascular Disease. *Physiology*. 2014;29(2):122–32.
29. Leitner Y, Fattal-Valevski A, Geva R, Eshel R, Toledano-Alhadeif H, Rotstein M, et al. Neurodevelopmental outcome of children with intrauterine growth retardation: a longitudinal, 10-year prospective study. *J Child Neurol*. 2007 May;22(5):580–7.
30. Fischi-Gómez E, Vasung L, Meskaldji D-E, Lazeyras F, Borradori-Tolsa C, Hagmann P, et al. Structural Brain Connectivity in School-Age Preterm Infants Provides Evidence for Impaired Networks Relevant for Higher Order Cognitive Skills and Social Cognition. *Cereb Cortex*. 2014;25(9):2793–805.
31. Guellec I, Lapillonne A, Renolleau S, Charlaluk M-L, Roze J-C, Marret S, et al. Neurologic outcomes at school age in very preterm infants born with severe or mild growth restriction. *Pediatrics*. 2011 Apr;127(4):e883-91.
32. Baschat AA. Fetal responses to placental insufficiency: an update. *BJOG*. 2004 Oct;111(10):1031–41.
33. Castillo-Melendez M, Yawno T, Allison BJ, Jenkin G, Wallace EM, Miller SL. Cerebrovascular adaptations to chronic hypoxia in the growth restricted lamb. *Int J Dev Neurosci*. 2015 Oct;45:55–65.
34. Baschat AA. Neurodevelopment following fetal growth restriction and its relationship with antepartum parameters of placental dysfunction. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011;37(5):501–14.
35. Cheung CY, Singh M, Ebaugh MJ, Brace RA. Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 1995 Sep;173(3 Pt 1):753–9.
36. Clark D, Smith S, He Y. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by

- the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol ...* 1998;1548:1540–8.
37. Clark DE, Smith SK, Sharkey AM, Charnock-Jones DS. Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Hum Reprod.* 1996 May;11(5):1090–8.
 38. Schiessl B, Innes BA, Bulmer JN, Otun HA, Chadwick TJ, Robson SC, et al. Localization of angiogenic growth factors and their receptors in the human placental bed throughout normal human pregnancy. *Placenta.* 2009 Jan;30(1):79–87.
 39. Regnault TRH, de Vrijer B, Galan HL, Davidsen ML, Trembler KA, Battaglia FC, et al. The relationship between transplacental O₂ diffusion and placental expression of PlGF, VEGF and their receptors in a placental insufficiency model of fetal growth restriction. *J Physiol.* 2003;550(2):641–56.
 40. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol.* 1986 Oct;93(10):1049–59.
 41. Boutsikou T, Malamitsi-Puchner A, Economou E, Boutsikou M, Puchner K-P, Hassiakos D. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in intrauterine growth restricted fetuses and neonates. *Early Hum Dev.* 2006 Apr;82(4):235–9.
 42. Szentpéteri I, Rab A, Kornya L, Kovács P, Joó JG. Gene expression patterns of vascular endothelial growth factor (VEGF-A) in human placenta from pregnancies with intrauterine growth restriction. *J Matern Neonatal Med.* 2013;26(10):984–9.
 43. Clifton VL. Review: Sex and the Human Placenta: Mediating Differential Strategies of Fetal Growth and Survival. *Placenta.* 2010;31(SUPPL.):S33–9.
 44. Walker MG, Fitzgerald B, Keating S, Ray JG, Windrim R, Kingdom JCP. Sex-specific basis of severe placental dysfunction leading to extreme preterm delivery. *Placenta.* 2012 Jul;33(7):568–71.
 45. Marsit CJ, Maccani MA, Padbury JF, Lester BM. Placental 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase methylation is associated with newborn growth and a measure of neurobehavioral outcome. Oudejans C, editor. *PLoS One.* 2012 Mar 14;7(3):e33794.
 46. Clifton VL, Murphy VE. Maternal asthma as a model for examining fetal sex-specific effects on maternal physiology and placental mechanisms that regulate human fetal growth. *Placenta.* 2004 Apr;25 Suppl A:S45-52.

47. Kalisch-Smith JI, Simmons DG, Dickinson H, Moritz KM. Review: Sexual dimorphism in the formation, function and adaptation of the placenta. *Placenta*. 2017 Aug;54(3):10–6.
48. Rosenfeld CS. Sex-specific placental responses in fetal development. *Endocrinology*. 2015;156(10):3422–34.
49. Kadić AS. Fetal neurology: The role of fetal stress. *Donald Sch J Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;9(1):30–9.
50. Gonzalez TL, Sun T, Koepfel AF, Lee B, Wang ET, Farber CR, et al. Sex differences in the late first trimester human placenta transcriptome. *Biol Sex Differ*. 2018;9(1):4.
51. Meakin AS, Saif Z, Jones AR, Aviles PFV, Clifton VL. Review: Placental adaptations to the presence of maternal asthma during pregnancy. *Placenta*. 2017;54:17–23.
52. Leon-Garcia SM, Roeder HA, Nelson KK, Liao X, Pizzo DP, Laurent LC, et al. Maternal obesity and sex-specific differences in placental pathology. *Placenta*. 2016;38(2016):33–40.
53. Challis J, Newnham J, Petraglia F, Yeganegi M, Bocking A. Fetal sex and preterm birth. *Placenta*. 2013;34(2):95–9.
54. Baschat AA. Planning management and delivery of the growth-restricted fetus. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018 May;49:53–65.
55. Nawathe A, David AL. Prophylaxis and treatment of foetal growth restriction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018 May;49:66–78.
56. Carr DJ, Wallace JM, Aitken RP, Milne JS, Martin JF, Zachary IC, et al. Peri- and Postnatal Effects of Prenatal Adenoviral VEGF Gene Therapy in Growth-Restricted Sheep1. *Biol Reprod*. 2016;94(6):1–12.
57. Baschat AA, Harman CR. Antenatal assessment of the growth restricted fetus. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2001 Apr;13(2):161–8.
58. Maeda K, Kurjak A. The Safe Use of Diagnostic Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. Kurjak A, Chervenak F, editors. *Donald Sch J Ultrasound Obstet Gynecol*. 2012 Jul;6(3):313–7.
59. Mayhew TM, Ohadike C, Baker PN, Crocker IP, Mitchell C, Ong SS. Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction. *Placenta*. 2003;24(2–3):219–26.
60. Regnault TRH, Orbus RJ, De Vrijer B, Davidsen ML, Galan HL, Wilkening RB, et al.

- Placental expression of VEGF, PlGF and their receptors in a model of placental insufficiency - Intrauterine growth restriction (PI-IUGR). *Placenta*. 2002;23(2–3):132–44.
61. Barut F, Barut A, Gun BD, Kandemir NO, Harma MI, Harma M, et al. Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis. *Diagn Pathol*. 2010 Apr 22;5(1):24.
 62. Ott WJ. The diagnosis of altered fetal growth. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1988 Jun;15(2):237–63.
 63. Lackman F, Capewell V, Richardson B, DaSilva O, Gagnon R. The risks of spontaneous preterm delivery and perinatal mortality in relation to size at birth according to fetal versus neonatal growth standards. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;184(5):946–53.
 64. Tolsa CB, Zimine S, Warfield SK, Freschi M, Rossignol AS, Lazeyras F, et al. Early alteration of structural and functional brain development in premature infants born with intrauterine growth restriction. *Pediatr Res*. 2004;56(1):132–8.
 65. Murotsuki J, Challis JR, Han VK, Fraher LJ, Gagnon R. Chronic fetal placental embolization and hypoxemia cause hypertension and myocardial hypertrophy in fetal sheep. *Am J Physiol*. 1997;272(1 Pt 2):R201-7.
 66. Figueroa H, Lozano M, Suazo C, Eixarch E, Illanes SE, Carreño JE, et al. Intrauterine growth restriction modifies the normal gene expression in kidney from rabbit fetuses. *Early Hum Dev*. 2012;88(11):899–904.
 67. Economides DL, Proudler A, Nicolaides KH. Plasma insulin in appropriate- and small-for-gestational-age fetuses. *Am J Obstet Gynecol*. 1989;160(5 PART 1):1091–4.
 68. Almond D, Currie J. Killing Me Softly: The Fetal Origins Hypothesis. *J Econ Perspect*. 2011;25(3):153–72.
 69. Grigore D, Ojeda NB, Robertson EB, Dawson AS, Huffman CA, Bourassa EA, et al. Placental insufficiency results in temporal alterations in the renin angiotensin system in male hypertensive growth restricted offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Aug;293(2):R804-11.
 70. Ojeda NB, Henington BS, Williamson DT, Hill ML, Betson NEE, Sartori-Valinotti JC, et al. Oxidative stress contributes to sex differences in blood pressure in adult growth-restricted offspring. *Hypertension*. 2012 Jul;60(1):114–22.
 71. Sundrani DP, Roy SS, Jadhav AT, Joshi SR. Sex-specific differences and developmental programming for diseases in later life. *Reprod Fertil Dev*. 2017;29(11):2085–99.

72. Hewitt DP, Mark PJ, Waddell BJ. Glucocorticoids prevent the normal increase in placental vascular endothelial growth factor expression and placental vascularity during late pregnancy in the rat. *Endocrinology*. 2006 Dec;147(12):5568–74.
73. Gluck O, Schreiber L, Marciano A, Mizrachi Y, Bar J, Kovo M. Pregnancy outcome and placental pathology in small for gestational age neonates in relation to the severity of their growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2019 May;32(9):1468–73.
74. Eriksson JG, Kajantie E, Osmond C, Thornburg K, Barker DJP. Boys live dangerously in the womb. *Am J Hum Biol*. 2010;22(3):330–5.
75. Fowden AL, Sferruzzi-Perri AN, Coan PM, Constancia M, Burton GJ. Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. *J Physiol*. 2009 Jul 15;587(Pt 14):3459–72.
76. Hayward CE, Lean S, Sibley CP, Jones RL, Wareing M, Greenwood SL, et al. Placental Adaptation: What Can We Learn from Birthweight:Placental Weight Ratio? *Front Physiol*. 2016;7(FEB):28.
77. Haavaldsen C, Samuelsen SO, Eskild A. Fetal death and placental weight/birthweight ratio: a population study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2013 May;92(5):583–90.
78. Wallace JM, Bhattacharya S, Horgan GW. Gestational age, gender and parity specific centile charts for placental weight for singleton deliveries in Aberdeen, UK. *Placenta*. 2013 Mar;34(3):269–74.
79. Luque-Fernandez MA, Ananth C V., Jaddoe VW V, Gaillard R, Albert PS, Schomaker M, et al. Is the fetoplacental ratio a differential marker of fetal growth restriction in small for gestational age infants? *Eur J Epidemiol*. 2015 Apr;30(4):331–41.
80. Tran N-T, Amarger V, Bourdon A, Misbert E, Grit I, Winer N, et al. Maternal citrulline supplementation enhances placental function and fetal growth in a rat model of IUGR: involvement of insulin-like growth factor 2 and angiogenic factors. *J Matern neonatal Med*. 2017 Aug;30(16):1906–11.

VIII. Životopis

Rođen sam 8.1.1995. u Virovitici. Pohađao sam Osnovnu školu Ivana Gorana Kovačića u Gornjem Bazju. Od 2009. do 2013. pohađao sam Gimnaziju Petra Preradovića Virovitica. Od 2013. do 2019. pohađam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Na fakultetu radio kao demonstrator iz anatomije i fiziologije. Aktivno koristim engleski jezik u pismu i govoru. Njemački konverzivni, položena razina A2-2.