

# Uloga proteina SUFU u povezivanju Wnt i Hedgehog signalnoga puta u posteljica s intrauterinim zastojem u rastu

---

Šola, Ida Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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:105:517468>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-25**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ida Marija Šola**

**Uloga proteina SUFU u povezivanju  
Wnt i Hedgehog signalnoga puta u  
posteljica s intrauterinim zastojem u  
rastu**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2024.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ida Marija Šola**

**Uloga proteina SUFU u povezivanju  
Wnt i Hedgehog signalnoga puta u  
posteljica s intrauterinim zastojem u  
rastu**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2024.

Disertacija je izrađena u Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ovaj rad je primio potporu Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu, Republika Hrvatska, i Europske unije kroz Europski fond za regionalni razvoj, pod ugovorom KK.01.1.1.01.0008, projekt "Reproduktivna i regenerativna medicina - istraživanje novih platformi i potencijala".

Voditelji rada: prof. dr. sc. Ljiljana Šerman, dr. med. i prof. dr. sc. Krunoslav Kuna, dr. med.

Leli i Tomislavu

*Najveća zahvala mojoj mentorici, prof. dr.sc. Ljiljani Šerman, na pruženoj prilici da me mentorira, na znanju koje mi je pružila, na savjetima, iskustvu, posvećenosti, podršci, strpljenju i vođenju kroz čitav projekt. Neizmjerne joj hvala na ljubavi prema znanosti koju mi je počela prenositi još od vremena studija.*

*Želim zahvaliti i drugom mentoru, prof. dr. sc. Krunoslavu Kuni, na podršci.*

*Ogromno hvala dr. sc. Valentini Karin Kujundžić, mag. biol. mol., na nesebičnoj stručnoj pomoći u svakom segmentu rada na istraživanju te na velikom znanju i svoj pruženoj podršci i prijateljstvu.*

*Zahvaljujem prof. dr sc. Aniti Škrtić na svim savjetima i pomoći te na patohistološkoj evaluaciji i imunohistokemijskoj analizi uzoraka posteljica te prof. dr sc. Semiru Vraniću.*

*Zahvaljujem doc. dr. sc. Frani Paiću, mag. biol. mol., na pomoći pri RT-qPCR i miRNA analizi te velikoj stručnoj podršci.*

*Zahvaljujem Ladi Lijović, dr. med., na velikoj pomoći pri statističkoj obradi i prikazu podataka.*

*Posebno hvala mojim roditeljima na ljubavi, podršci i što su mi pružili uvjete da se obrazujem i rastem te me zarazili ljubavlju prema znanju. Hvala mojoj sestri Jani na ljubavi i velikoj podršci te mome suprugu Vedranu na ljubavi, zajedništvu i razumijevanju.*

| <b>Sadržaj</b>                                                         | <b>str.</b> |
|------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 1. UVOD I SVRHA RADA                                                   | 1           |
| 1.1. POSTELJICA                                                        | 3           |
| 1.1.1. Funkcija posteljice                                             | 4           |
| 1.1.2. Razvoj posteljice                                               | 5           |
| 1.1.3. Diferencijacija i invazija trofoblasta                          | 8           |
| 1.1.4. Razvoj korionskih resica i uspostava uteroplacentarnog krvotoka | 9           |
| 1.2. INTRAUTERINI ZASTOJ RASTA                                         | 12          |
| 1.2.1. Fetalni rast                                                    | 12          |
| 1.2.2. Krivulje fetalnog rasta                                         | 12          |
| 1.2.3. Definicija i dijagnoza zastoja fetalnog rasta                   | 15          |
| 1.2.4. Etiologija i faktori rizika                                     | 17          |
| 1.2.4.1. Faktori rizika za nastanak IUGR-a od strane majke             | 18          |
| 1.2.4.2. Faktori rizika za nastanak IUGR-a od strane ploda             | 19          |
| 1.2.4.3. Faktori rizika za nastanak IUGR-a od strane posteljice        | 20          |
| 1.2.5. Patofiziologija i vrste IUGR-a                                  | 21          |
| 1.2.6. Praćenje trudnoće s IUGR-om                                     | 22          |
| 1.2.7. Način i vrijeme porođaja djeteta s IUGR-om                      | 25          |
| 1.2.8. Kratkotrajne i dugotrajne posljedice IUGR-a                     | 27          |
| 1.3. SIGNALNI PUT WINGLESS                                             | 29          |
| 1.3.1. Ključni sudionici signalnog puta Wnt                            | 30          |
| 1.3.1.1. Wnt ligandi i WNT5A                                           | 30          |
| 1.3.1.2. Frizzled receptori                                            | 30          |
| 1.3.1.3. $\beta$ -katenin                                              | 31          |
| 1.3.1.4. Destrukcijski kompleks                                        | 31          |
| 1.3.1.5. Dishevelled                                                   | 31          |
| 1.3.1.6. TCF/LEF                                                       | 32          |
| 1.3.2. Vrste signalnih puteva Wnt                                      | 32          |
| 1.3.2.1. Kanonski put Wnt put                                          | 33          |
| 1.3.2.2. Nekanonski put i uloga WNT5A                                  | 35          |

|          |                                                                                             |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.3.3.   | Wnt signalizacija u posteljici i uloga WNT5A i $\beta$ -katenina                            | 36 |
| 1.4.     | SIGNALNI PUT HEDGEHOG                                                                       | 37 |
| 1.4.1.   | Ključni sudionici signalnog puta Hh                                                         | 39 |
| 1.4.1.1. | Hh ligandi                                                                                  | 39 |
| 1.4.1.2. | PTCH                                                                                        | 40 |
| 1.4.1.3. | SMO                                                                                         | 41 |
| 1.4.1.4. | KIF7                                                                                        | 41 |
| 1.4.1.5. | GLI                                                                                         | 42 |
| 1.4.1.6. | SUFU                                                                                        | 42 |
| 1.4.2.   | Vrste signalnog puta Hh                                                                     | 45 |
| 1.4.3.   | Hh signalizacija                                                                            | 46 |
| 1.4.4.   | Moguće poveznice i interakcije između signalnih puteva Wnt i Hh                             | 48 |
| 1.4.5.   | Signalni put Hh i posteljica                                                                | 48 |
| 1.5.     | VAŽNOST POJEDINIH EPIGENETSKIH MEHANIZAMA U POSTELJICI                                      | 50 |
| 1.5.1.   | Metilacija DNA i njezina uloga u posteljici                                                 | 50 |
| 1.5.2.   | Mikro RNA i njezina uloga u posteljici                                                      | 52 |
| 2.       | HIPOTEZA                                                                                    | 55 |
| 3.       | CILJEVI                                                                                     | 56 |
| 4.       | MATERIJALI I METODE                                                                         | 57 |
| 4.1.     | Klinički podaci                                                                             | 57 |
| 4.2.     | METODE                                                                                      | 58 |
| 4.2.1.   | Imunohistokemija                                                                            | 58 |
| 4.2.2.   | Izolacija genomske DNA iz FFPE- tkiva                                                       | 60 |
| 4.2.3.   | PCR ovisan o metilaciji                                                                     | 61 |
| 4.2.4.   | Ekstrakcija RNA                                                                             | 62 |
| 4.2.5.   | Reverzna transkripcija i kvantitativna lančana reakcija polimerazom (engl. <i>RT-qPCR</i> ) | 63 |
| 4.2.6.   | Mikro RNA analiza                                                                           | 65 |
| 4.2.7.   | Statistička analiza                                                                         | 65 |
| 5.       | REZULTATI                                                                                   | 67 |



|          |                                                                                                                             |    |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1.     | Klinički podaci                                                                                                             | 67 |
| 5.2.     | WNT5A                                                                                                                       | 69 |
| 5.2.1.   | mRNA ekspresija gena <i>WNT5A</i> u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini                                        | 69 |
| 5.2.2.   | Proteinska ekspresija WNT5A u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini                                              | 70 |
| 5.3.     | $\beta$ -KATENIN                                                                                                            | 74 |
| 5.3.1.   | mRNA ekspresija gena <i>CTNNB1</i> u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini                                       | 74 |
| 5.3.2.   | Proteinska ekspresija $\beta$ -katenina u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini                                  | 75 |
| 5.4.     | SUFU                                                                                                                        | 78 |
| 5.4.1.   | mRNA ekspresija gena <i>SUFU</i> u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini                                         | 78 |
| 5.4.2.   | Proteinska ekspresija SUFU u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini                                               | 79 |
| 5.4.3.   | Epigenetska regulacija ekspresije gena <i>SUFU</i> u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini                       | 82 |
| 5.4.3.1. | Ekspresija miR- 314-3p i miR378a-5p u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini                                      | 82 |
| 5.4.3.2. | Metilacijski status promotora gena <i>SUFU</i> u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini                           | 84 |
| 5.5.     | Korelacijska analiza ekspresije proteina WNT5A, $\beta$ -katenina i SUFU u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini | 85 |
| 6.       | RASPRAVA                                                                                                                    | 89 |
| 6.1.     | Klinički podaci                                                                                                             | 89 |
| 6.2.     | Proteinska ekspresija WNT5A i $\beta$ -katenina                                                                             | 90 |
| 6.3.     | Proteinska ekspresija SUFU                                                                                                  | 93 |
| 6.4.     | Metilacijski status promotora gena SUFU                                                                                     | 95 |
| 6.5.     | Regulacija ekspresije gena <i>SUFU</i> putem miR-214-3p i miR-378a-5p                                                       | 96 |
| 7.       | ZAKLJUČAK                                                                                                                   | 99 |

|     |                             |     |
|-----|-----------------------------|-----|
| 8.  | SAŽETAK                     | 100 |
| 9.  | SAŽETAK NA ENGLISKOM JEZIKU | 101 |
| 10. | POPIS LITERATURE            | 102 |
| 11. | ŽIVOTOPIS                   | 133 |

## POPIS KRATICA

|         |                                                                                                                                                                  |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AC      | engl. <i>Abdominal circumference</i> , opseg abdomena                                                                                                            |
| ACM     | lat. <i>Arteria cerebri media</i> , središnja moždana arterija                                                                                                   |
| ACOG    | engl. <i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>                                                                                                 |
| AdSPC   | engl. <i>Adventitial Stem/Progenitor Cell</i> , matične/progenitorske stanice adventicije                                                                        |
| AFI     | engl. <i>Amniotic fluid index</i> , indeks plodove vode                                                                                                          |
| APC     | engl. <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>                                                                                                                          |
| ARDS    | engl. <i>Acute respiratory distress syndrome</i> , akutni respiracijski distresni sindrom                                                                        |
| ART     | engl. <i>Assisted Reproductive Technology</i> , metode pomognute oplodnje                                                                                        |
| AT      | <i>Angiotenzin</i>                                                                                                                                               |
| AU      | lat. <i>Arteria umbilicalis</i> , umbilikalna arterija                                                                                                           |
| BMI     | engl. <i>Body mass index</i> , indeks tjelesne mase                                                                                                              |
| BMP     | engl. <i>Bone Morphologic Protein</i> , koštani morfogenetski protein                                                                                            |
| BMP 2/7 | engl. <i>Bone Morphogenetic Protein 2/7</i>                                                                                                                      |
| BPD     | engl. <i>Biparietal diameter</i> , biaparijatalni dijametar                                                                                                      |
| BPP     | engl. <i>Biophysical profile</i> , biofizički profil                                                                                                             |
| CBP     | engl. <i>CREB binding protein</i> , transkripcijski faktor CBP                                                                                                   |
| cDNA    | engl. <i>copy DNA</i>                                                                                                                                            |
| CE      | engl. <i>Convergent extension</i>                                                                                                                                |
| CERRM   | engl. <i>Scientific Center of Excellence for Reproductive and Regenerative Medicine</i> , Znanstveni centar izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu |
| cGMP    | engl. <i>Cyclic guanosine monophosphate</i> , ciklički gvanozin-monofosfat                                                                                       |

|              |                                                                                             |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ci           | engl. <i>Cubitus interruptus</i> , transkripcijski factor Ci                                |
| CK1          | engl. <i>Casein Kinase 1</i> , kazein kinaza                                                |
| CK1 $\alpha$ | engl. <i>Casein Kinase 1<math>\alpha</math></i>                                             |
| CMV          | <i>Citomegalo virus</i>                                                                     |
| CPM          | engl. <i>Confined placental mosaicism</i> , mozaicizam ograničen samo na posteljicu         |
| CRD          | engl. <i>Cistein-rich domain</i> , domena bogata cisteinom                                  |
| CRL          | engl. <i>Crown-rump length</i> , duljina od tjemena do trtice                               |
| CRM-1        | engl. <i>Chromosome Maintenance 1/Exportin-1</i> , eksportin-1                              |
| CTB          | engl. <i>Cytotrophoblast</i> , citotrofoblast                                               |
| Ctg          | engl. <i>Cardiotocography</i> , kardiokografija                                             |
| CTNNB1       | engl. <i>Catenin Beta 1</i> , gen koji kodira protein $\beta$ -katenin                      |
| DAB          | engl. <i>3,3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride</i> , 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorid |
| DHH          | engl. <i>Desert Hedgehog</i>                                                                |
| DIGITAT      | engl. <i>Disproportionate intrauterine growth intervention trial at term</i>                |
| Dkk          | engl. <i>Dickkopf-1</i>                                                                     |
| DNA          | engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i> , deoksiribonukleinska kiselina                          |
| DNMT         | engl. <i>DNA methyltransferase</i> , DNA metiltransferaza                                   |
| DV           | lat. <i>Ductus venosus</i>                                                                  |
| DVL/Dsh      | engl. <i>Dishevelled</i>                                                                    |
| eCTB         | engl. <i>Endovascular CTB</i> , endovaskularni citotrofoblast                               |
| EDF          | engl. <i>End-diastolic flow</i> , protok na kraju dijastole                                 |
| EFW          | engl. <i>Estimated fetal weight</i> , ultrazvučna procjena mase ploda                       |
| EMT          | engl. <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i> , epitelno mezenhimalna tranzicija           |

|              |                                                                                                  |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EPC          | engl. <i>Ecto placental Cone</i> , ektoplacentalni konus                                         |
| EVT          | engl. <i>Extravillous trophoblast</i> , ekstravilozni trofoblast                                 |
| FFPE         | engl. <i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i> , formalin fiksirano i u parafin uklopljeno        |
| FGF          | engl. <i>Fibroblast growth factor</i> , faktor rasta fibroblasta                                 |
| FGLS         | engl. <i>Fetal growth longitudinal study</i>                                                     |
| FGR          | engl. <i>Fetal growth restriction</i> , fetalni zastoj u rastu                                   |
| FL           | engl. <i>Femoral length</i> , duljina bedrene kosti                                              |
| FOXC2        | engl. <i>Forkhead Box protein C2</i> , transkripcijski faktor FOXC2                              |
| Fz           | engl. <i>Frizzled</i> , receptor Fz                                                              |
| GAPDH        | engl. <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> , gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza     |
| GLI 1-3      | engl. <i>Glioma-Associated Oncogene 1-3</i>                                                      |
| GLI-A        | engl. <i>GLI-Activator</i>                                                                       |
| GLI-FL       | engl. <i>GLI-Full length</i>                                                                     |
| GLI-R        | engl. <i>GLI-Repressor</i>                                                                       |
| GRIT         | engl. <i>Growth restriction intervention trail</i>                                               |
| GRK2         | engl. <i>G Protein-Coupled Receptor Kinase 2</i> , receptorska kinaza 2 povezana s G-proteinom   |
| GSK3 $\beta$ | engl. <i>Glycogen Synthase kinase 3<math>\beta</math></i> , glikogen-sintaza-kinaza 3 $\beta$    |
| GVHD         | engl. <i>Graft-versus-host disease</i> , transplantacijska bolest /reakcija presatka na domaćina |
| HC           | engl. <i>Head circumference</i> , opseg glave                                                    |
| HCG          | engl. <i>Human Chorionic Gonadotropin</i> , humani korionski gonadotropin                        |
| Hh           | engl. <i>Hedgehog</i>                                                                            |
| HLA          | engl. <i>Human leukocyte antigene</i> , humani leukocitni antigen                                |

|              |                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HPL          | engl. <i>Human Placental Lactogen</i> , humani placentalni laktogen                             |
| iCTB         | engl. <i>Interstitial CTB</i> , intersticijski citotrofoblast                                   |
| IGF          | engl. <i>Insulin-like Growth Factor</i> , inzulinu sličan faktor rasta                          |
| IGF2         | engl. <i>Insulin-like Growth Factor 2</i>                                                       |
| IHH          | engl. <i>Indian Hedgehog</i>                                                                    |
| IL-1         | engl. <i>Interleukin-1</i> , interleukin-1                                                      |
| IP3          | engl. <i>Inositol 1,4,5- trisphosphate</i> , inozitol 1,4,5-trisfosfat                          |
| IUGR         | engl. <i>Intrauterine growth restriction</i> , intrauterini zastoje rasta ploda                 |
| IWP-2        | engl. <i>Inhibitor of Wnt production 2</i>                                                      |
| JNK          | engl. <i>c-jun N-terminal kinase</i> , kinaza JNK                                               |
| KIF7         | engl. <i>Kinesin Family Member 7</i>                                                            |
| LMP          | engl. <i>Last menstrual period</i> , prvi dan posljednje menstruacije                           |
| LRP-5, LRP-6 | engl. <i>Low-density-lipoprotein-related protein 5/6</i>                                        |
| miRNA/miR    | engl. <i>micro RNA</i> , mikro RNA                                                              |
| MMP9         | engl. <i>Matrix metalloproteinase 9</i> , matriks metaloproteinaza 9                            |
| MSP          | engl. <i>Methylation-specific PCR</i> , PCR ovisan o metilaciji                                 |
| NBCCS        | engl. <i>Nevoid basal cell carcinoma syndrom</i> , sindrom nevoidnog karcinoma bazalnih stanica |
| NLK          | engl. <i>Nemo-Like Kinase</i> , kinaza NLK                                                      |
| NO           | engl. <i>Nitrogen oxide</i> , dušikov oksid                                                     |
| NRH1         | engl. <i>Neutrophin Receptor Homolog 1</i>                                                      |
| NST          | engl. <i>Non-stress test</i> , test fetalne reaktivnosti bez opterećenja                        |
| PC           | engl. <i>Primary cilia</i> , primarne cilije                                                    |
| PCP          | engl. <i>Planar Cell Polarity</i>                                                               |
| PCR          | engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> , lančana reakcija polimeraze                            |

|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PDGF         | engl. <i>Platelet-derived growth factor</i> , faktor rasta krvnih pločica                                                                       |
| PGE2         | engl. <i>Prostaglandin E2</i> , prostaglandin E2                                                                                                |
| PIGF         | engl. <i>Placental growth factor</i> , placentalni faktor rasta                                                                                 |
| PKA          | engl. <i>Protein Kinase A</i> , protein kinaza A                                                                                                |
| PLC          | engl. <i>Phospholipase C</i> , fosfolipaza C                                                                                                    |
| PTCH         | engl. <i>Protein patched homolog; Patched</i>                                                                                                   |
| PTK7         | engl. <i>Protein Tyrosine kinase 7</i> , proteinska tirozin kinaza 7                                                                            |
| Ras/MAPK put | engl. <i>Rat Sarcoma/Mitogen-Activated Protein Kinase</i>                                                                                       |
| RIOK3        | engl. <i>RIO kinase 3</i>                                                                                                                       |
| ROCK         | engl. <i>Rho-associated kinase</i> , kinaza ROCK                                                                                                |
| ROR2         | engl. <i>Receptor Tyrosin Kinase like Orphan Receptor 2</i>                                                                                     |
| ROS          | engl. <i>Reactive oxygen species</i> , reaktivni metaboliti kisika                                                                              |
| RT-qPCR      | engl. <i>Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction</i> , reverzna transkripcija i kvantitativna lančana reakcija polimerazom |
| SFRP         | engl. <i>Soluble Fizzled-related protein</i>                                                                                                    |
| SGA          | engl. <i>Small for gestational age</i> , nedostašće                                                                                             |
| SHH          | engl. <i>Sonic Hedgehog</i>                                                                                                                     |
| SMC          | engl. <i>Smooth Muscle Cell</i>                                                                                                                 |
| SMFM         | engl. <i>Society for Maternal-Fetal Medicine</i>                                                                                                |
| SMO          | engl. <i>Smoothened</i>                                                                                                                         |
| STB          | engl. <i>Syncytiotrophoblast</i> , sinciotrofoblast                                                                                             |
| SUA          | engl. <i>Single umbilical artery syndrome</i> , sindrom jedne umbilikalne arterije                                                              |
| SUFU         | engl. <i>Suppressor of Fused</i>                                                                                                                |
| TAE          | engl. <i>Tris-Acetate-EDTA</i> , pufer TAE                                                                                                      |
| TAK1         | engl. <i>Transforming growth factor-<math>\beta</math>-activated kinase 1</i>                                                                   |

|                        |                                                                                                                                                        |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TBS                    | engl. <i>T<u>r</u>is-<u>B</u>uffered <u>S</u>aline</i> , Tris pufer                                                                                    |
| TCF/LEF                | engl. <i>T-<u>c</u>ell <u>F</u>actor/<u>L</u>ymphoid-<u>e</u>nhanced binding <u>F</u>actor</i>                                                         |
| TGF $\alpha$ / $\beta$ | engl. <i>T<u>r</u>ansforming <u>G</u>rowth <u>F</u>actor <math>\alpha</math>/<math>\beta</math></i> , transformirajući factor rasta $\alpha$ / $\beta$ |
| TGF $\beta$            | engl. <i>T<u>r</u>ansforming <u>G</u>rowth <u>F</u>actor <math>\beta</math></i>                                                                        |
| TIMP                   | engl. <i>T<u>i</u>ssue <u>i</u>nhibitors of <u>m</u>etallo<u>p</u>roteinase</i>                                                                        |
| TNF $\alpha$           | engl. <i>T<u>u</u>mor <u>n</u>ecrosis factor <u><math>\alpha</math></u></i>                                                                            |
| TORCH                  | engl. <i>T<u>o</u>xoplasmosis, <u>O</u>ther, <u>R</u>ubella, <u>C</u>ytomegalovirus, <u>H</u>erpes Simplex</i>                                         |
| VEGF                   | engl. <i>V<u>a</u>scular <u>e</u>ndothelial growth <u>f</u>actor</i> , faktor rasta endotela krvnih žila                                               |
| VEGF-A                 | engl. <i>V<u>a</u>scular <u>E</u>ndothelial <u>G</u>rowth <u>F</u>actor <u>A</u></i>                                                                   |
| WHO                    | engl. <i>W<u>o</u>ld <u>H</u>ealth <u>O</u>rganization</i> , Svjetska zdravstvena organizacija                                                         |
| WIF                    | engl. <i>W<u>nt</u> <u>I</u>nhibitory <u>F</u>actor</i>                                                                                                |
| Wnt                    | engl. <i>W<u>ingless</u>/<u>I</u>nt1</i>                                                                                                               |



# 1. UVOD I SVRHA RADA

Posteljica je privremeni organ koji dijele majka i dijete i neophodna je za uspješnu trudnoću. Unatoč njezinoj neprocjenjivoj zaslugi za naše postojanje, još uvijek je najmanje istražen ljudski organ te uz njezin razvoj i funkciju vežemo još mnogo nepoznanica (1). Posteljica ima respiratornu, nutritivnu, metaboličku, imunološku i endokrinu ulogu te djeluje kao regulator intrauterinog okoliša na koji utječe niz vanjskih faktora koji mogu modulirati njezinu funkciju (2). Tijekom čitave trudnoće posteljica se neprestano prilagođava rastućim potrebama ploda što je presudno za održanje i napredovanje trudnoće.

Za njezinu urednu funkciju presudne su implantacija i placentacija koje su složeni i precizno regulirani procesi u koje je uključeno niz različitih regulatora i staničnih puteva (3,4).

Intrauterini zastoj u rastu ploda (engl. *Intrauterine growth restriction*, IUGR) je kompleksan poremećaj u trudnoći koji označava nemogućnost ploda da ostvari svoj puni genetski potencijal za rast, a uzrokuje značajno povišenje perinatalnog i neonatalnog morbiditeta i mortaliteta. Naime, pokazano je da je kod IUGR-a perinatalni mortalitet 6 - 10 puta veći nego u djece s urednom porođajnom masom (5). Dijagnoza se temelji na ultrazvučnoj procjeni mase ploda ispod 10. centile za gestacijsku dob prema utvrđenim krivuljama fetalnog rasta te se pojavljuje u oko 10% trudnoća (6). Najčešći uzrok IUGR-a u strukturno i kromosomski zdravih plodova je uteroplacentarna insuficijencija (7).

Adekvatna invazija trofoblasta je jedan od ključnih trenutaka u ranoj trudnoći, s obzirom da će u slučaju izostale invazije doći do pobačaja, dok se plitka invazija povezuje s nastankom IUGR-a i preeklampsije (8). Naime, abnormalna placentacija i placentna vaskularna bolest dovode do uteroplacentarne insuficijencije, kronične hipoksije i razvoja IUGR-a (9).

Brojna istraživanja su pokazala da je signalni put Wnt neophodan za urednu implantaciju i placentaciju (3,4). Jedan od njegovih ključnih sudionika,  $\beta$ -katenin, transkripcijski je kofaktor u kanonskom signalnom putu Wnt za kojeg je pokazano da je odsudan za regulaciju epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) (10). Njegov drugi vrlo bitan pozitivni regulator je WNT5A, jedan od rijetkih ekstracelularnih liganda koji osim kanonskog može pokrenuti signalizaciju i na oba nekanonska signalna puta Wnt. Štoviše, pokazano je da poticanjem signalizacije na nekanonskim signalnim putevima Wnt može djelovati i kao negativni regulator kanonskog puta

Wnt, što njegovu ulogu čini još kompleksnijom (11). WNT5A potiče migraciju stanica te je nađeno da njegov gubitak sprječava implantaciju, decidualizaciju i razvoj posteljice (12,13).

Signalni putevi Hh i Wnt imaju presudnu ulogu u implantaciji i razvoju posteljice (14). Naime, signalni put Hh ima važnu ulogu u vaskulogenezi i angiogenezi u posteljici. Utvrđeno je da može izravno djelovati na poticanje stvaranja endotelnih stanica krvnih žila te potaknuti potporne stanice krvnih žila na proizvodnju vaskularnih faktora rasta, čime može regulirati kako njihov nastanak tako i daljnji razvoj (15,16).

Nadalje, signalizacija Hh potiče niz procesa koji su neophodni za urednu placentaciju kao što su diferencijacija citotrofoblasta, fuzija citotrofoblasta i sinciotrofoblasta te EMT u stanicama humanog trofoblasta (17,18). SUFU je ključni negativni regulator signalnog puta Hh čija se negativna regulacija odvija i u citoplazmi i u jezgri stanice tako što modulira lokalizaciju i stabilnost transkripcijskih proteina GLI (19,20). Čini se da bi SUFU, osim što je negativni regulator signalnog puta Hh, mogao biti negativni regulator i signalnog puta Wnt. S obzirom na to da su i signalni put Hh i Wnt ključni za diferencijaciju i proliferaciju trofoblasta te za urednu placentaciju, SUFU bi mogao djelovati kao koordinator i svojevrsna poveznica u interakciji između ovih puteva (21).

Daljnje rasvjetljavanje ekspresije proteina signalnih puteva Hh i Wnt te posebno nedovoljno neistraženog proteina SUFU i njegove regulacije u stanicama posteljice poslužit će u svrhu boljeg razumijevanja nastanka patoloških promjena u posteljicama trudnoća s IUGR-om.

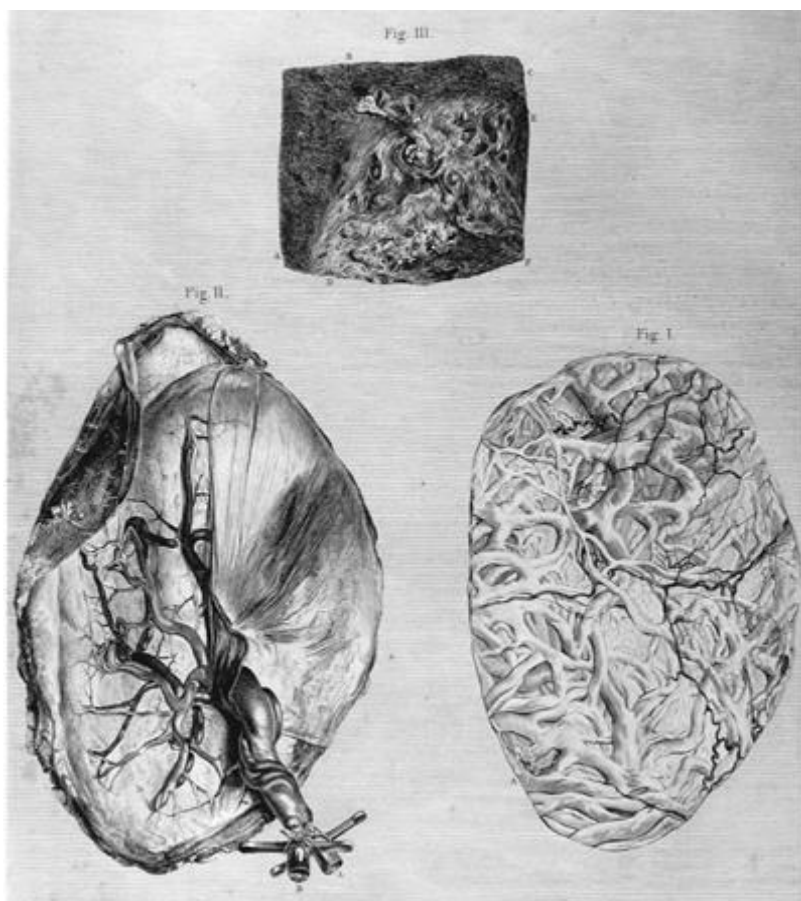
## 1.1. POSTELJICA

Posteljica je kolijevka našega života jer nam osigurava preživljenje i razvoj do trenutka porođaja. Ipak, unatoč njezinoj važnosti, još je uvijek najmanje istraženi ljudski organ, pa je stoga uz njezin razvoj i funkciju vezan niz nepoznanica. Ime joj potječe od latinske riječi za kolač (lat. *Placenta*), koja pak potječe iz starogrčke riječi za ploču (grč. *Πλάζ*) (1).

Svijest o važnosti posteljice postoji još od početaka civilizacije, pa su tako u starom Egiptu smatrali da posteljica sadrži dio duše djeteta s čime se slažu predaje mnogih naroda Azije, Afrike, Australije i pacifičkih otoka koje su pored navedenog u svojim vjerovanjima posteljici pridavale i druge nadnaravne moći ili je pak smatrale bratom odnosno sestrom djeteta. Smatra se da je grčki filozof Diogen iz Apolonije oko 450. pr. Kr. prvi ustvrdio da je posteljica organ koji služi za prehranu ploda (22).

Tijekom renesanse počinje aktivno proučavanje posteljice u zapadnoj civilizaciji pa tako J.C. Arantius (Aranzi; 1529/1530-1589) u 16. stoljeću navodi da posteljica „pročišćava“ krv nazvavši je jetrom maternice (lat. *hepar uterinus*) te utvrđuje da je cirkulacija ploda odvojena od cirkulacije majke. Stoljeće kasnije J. Mayow (1641-1679) zaključuje da posteljica ustvari predstavlja respiratorni organ ploda te je naziva plućima maternice (lat. *pulmo uterinus*) (23). W. Hunter (1718-1783) u 18. stoljeću objavljuje prve vrlo detaljne opise anatomske strukture posteljice u svom opstetričkom atlasu (engl. *The Gravid Uterus*, 1774.) (Slika 1) (24).

Uz navedene pionire ovog područja, postojao je još niz istraživača čiji doprinos je zaslužan za sve što danas znamo o posteljici. Ipak, tek je u 20. stoljeću prvi puta prepoznata uloga posteljice kao endokrinog organa (23). Čak i danas, u 21. stoljeću o posteljici se ne zna dovoljno, stoga je 2014. godine u SAD-u pokrenut 80-ak milijuna dolara vrijedan „Projekt humane posteljice“ (engl. *Human Placenta Project*) čiji je cilj daljnje rasvjetljavanje njezine strukture, razvoja i funkcije (25).



**Slika 1.** Anatomska slika maternalne (Fig I) i fetalne strane posteljice (Fig II) te uterinog mjesta implantacije posteljice (Fig III) objavljenih u opstetričkom atlasu W. Huntera. Preuzeto iz (23).

### 1.1.1. Funkcija posteljice

Posteljica je privremeni organ koji dijele majka i dijete, a velikim dijelom se razvija iz stanica koje se pojavljuju već 3 do 4 dana nakon oplodnje, na samom početku trudnoće. O adekvatnom razvoju i funkciji posteljice ovisi opstanak i napredovanje te uspješnost trudnoće, odnosno omogućavanje optimalnih uvjeta i supstrata za preživljenje i razvoj zrelog djeteta sposobnog za život nakon porođaja. Rana trudnoća je ključno vrijeme kako za razvoj posteljice, tako i za razvoj svih organskih sustava ploda te će ti rani događaji uvelike odrediti daljnji tijek trudnoće i njezin uspješan ishod (26).

Uspostava funkcije posteljice događa se krajem prvog tromjesečja trudnoće te se tijekom daljnje trudnoće posteljica kontinuirano razvija i mijenja kako bi mogla udovoljiti rastućim potrebama ploda sve do u treće tromjesečje, kada oko 36. tjedna gestacije započinju njezine

regresivne promjene. Prema kraju trudnoće dolazi do smanjenja površine posteljičnih resica i posljedično smanjene izmjene tvari između majke i ploda (27,28). Kako je programiran njezin ograničeni rok trajanja, do sada još ostaje uvelike nepoznato.

Posteljica ima respiratornu, nutritivnu, metaboličku, imunološku i endokrinu ulogu te djeluje kao regulator intrauterinog okoliša s obzirom na to da na nju može djelovati čitav niz vanjskih i unutarnjih faktora koji mogu modulirati njezinu funkciju (2). Preko posteljične membrane odvija se transport hranjivih tvari prema plodu te otpadnih tvari prema majci. Između majke i ploda se transport odvija običnom difuzijom (kisik, ugljični dioksid, lipidi, kreatinin, ureja, lijekovi i sl.), olakšanom difuzijom (pomoću nosača - npr. glukoza), aktivnim transportom (npr. aminokiseline), ultrafiltracijom (Na, Cl, K) i pinocitozom (IgG) (27,29).

Osim toga, posteljica ima i metaboličku funkciju jer sintetizira glikogen, kolesterol i masne kiseline. U sklopu svoje endokrine uloge sintetizira humani korionski gonadotropin (HCG), humani placentalni laktogen (HPL), prolaktin, relaksin, inzulinu sličan faktor rasta (engl. *Insulin-like growth factor*, IGF), progesteron i estrogene, najviše estriol, te mnoge druge tvari čija funkcija još ostaje uvelike nepoznata. Posteljica ima i hematopoetsku ulogu, s obzirom da je izvor hematopoetskih prastanica (27,30). Osim prolaska IgG protutijela prema plodu, imunološka uloga posteljice je uz remodelaciju imunološkog sustava majke presudna za očuvanje trudnoće jer priječi reakciju odbacivanja s obzirom na to da su posteljica i plod biološki gledano polu presadci (engl. *Semi-allograft*) (Slika 2A i 2C). Zato trofoblast, koji je u doticaju s majčinom krvlju, ispoljava specifične humane leukocitne antigene (engl. *Human leukocyte antigene*, HLA), naročito HLA-G i HLA-E (31).

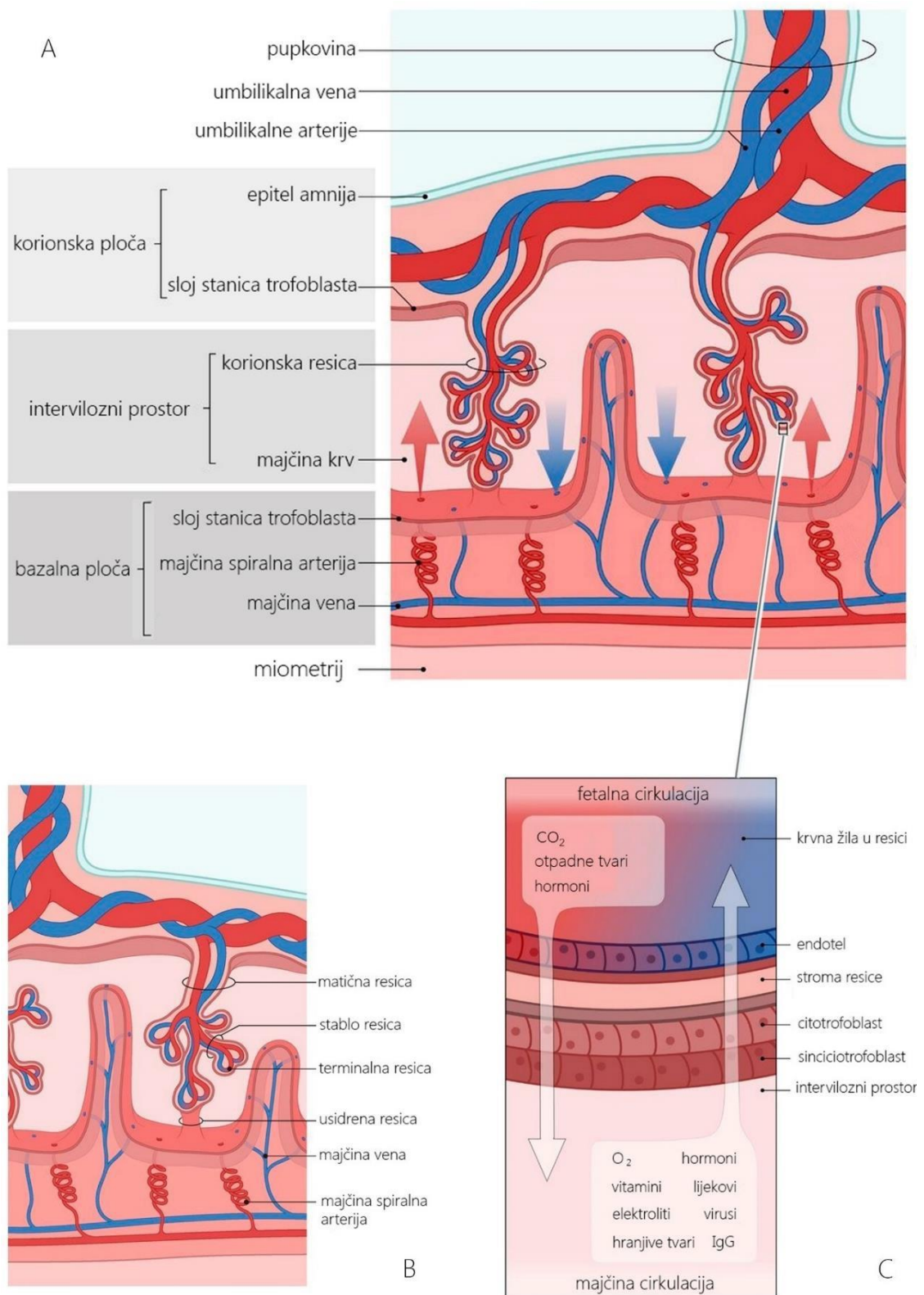
### **1.1.2. Razvoj posteljice**

Od oplodnje do 8. dana traje prvi stadij razvoja posteljice - prelakunarni stadij. Nakon oplodnje u jajovodu nastaje zigota koja se mitotički dijeli do 16-staničnog stadija kada kreće prva diferencijacija stanica tijekom embrionalnog razvoja. Daljnjom diobom se iz unutarnje stanične mase (engl. *Inner cell mass*) razvije embrioblast koji će biti osnova za razvoj zametka i svih njegovih tkiva, organskih sustava i pupkovine. Od vanjske stanične mase (engl. *Outer cell mass*) se razvijaju trofoektodermalne stanice i potom trofoblast iz kojeg će nastati fetalni dio posteljice i embrionalna ovojnica, korion (32).

Šupljina između unutarnjeg i vanjskog sloja stanica, blastocel, puni se tekućinom prošlom kroz zonu pelucidu te tako nastaje blastocista koja ulazi u šupljinu maternice (28,30). Već 6. dana od oplodnje se blastocista embrionalnim polom priljubljuje uz endometriju koji je sekrecijski promijenjen pod utjecajem velikih doza progesterona te dolazi do decidualne reakcije isprva oko mjesta implantacije, a potom u čitavom endometriju, kojom se stromalne i krvožilne endometralne stanice mijenjaju te uz endokrinu ulogu (izlučuju IGF, relaksin i prolaktin) stvaraju zalihe lipida, glikogena i proteina (33). Sve do 9. tjedna gestacije prehrana zametka ovisit će o izlučivanju tih tvari iz pripremljenih endometralnih žlijezda u intervilozni prostor. Nakon toga počinje dotok majčine krvi u intervilozni prostor. Konačna uspostava uteroplacentarnog krvotoka događa se tek krajem prvog tromjesečja, o čemu će više biti govora u nastavku (27).

Nadalje, trofoblast sintetizira proteolitičke enzime i faktore koji razgrađuju izvanstanični matriks čime dolazi do apoptoze endometralnih epitelih stanica i postiže se ugnježđivanje blastociste u endometralnu stromu. U spomenutom procesu sudjeluje niz matriks metaloproteinaza (engl. *Matrix metalloproteinase*, MMP) i njihovih inhibitora (engl. *Tissue inhibitors of metalloproteinase*, TIMP), citokina, interleukin 1 (IL1) te laminin i fibronektin, koštani morfogenetički proteini 2 i 7 (engl. *Bone morphogenetic protein 2,7*, BMP 2,7) te prostaglandin E2 (PGE2) (27). Uspješna implantacija blastociste ovisi o nizu sinkroniziranih događaja između blastociste i pomno pripremljenog endometrija.

Zrela posteljica ima promjer oko 20 cm, debljine je oko 3 cm, te mase oko 500 g. Prema podrijetlu, sastoji se od majčinog (lat. *pars materna*) i fetalnog dijela (lat. *pars fetalis*). Fetalni dio, koji nastaje od trofoblasta i izvanembionalnog mezoderma, čine korionska ploča koja nastaje srastanjem amniona i resičastog koriona, a u njezinom mezenhimu nalaze se ogranci umbilikalnih krvnih žila - arterije i vene korionske ploče te posteljične resice. Maternalni dio čine bazalna decidua, posteljične pregrade i intervilozni prostor koji ispunjava majčina krv (30). Maternalna površina ili bazalna ploča je podijeljena na 10 - 40 kotiledona odvojenih septima/pregradama odnosno naborima decidue koji ne dopiru nikada do korionske ploče tako da majčina krv teče slobodno oko svih kotiledona u jedinstvenom interviloznom prostoru (28) (Slika 2A i 2B).



**Slika 2.** Građa posteljice (A, B) i izmjena tvari između majke i ploda (C). Preuzeto i preuređeno iz (34).

### 1.1.3. Diferencijacija i invazija trofoblasta

Već 7. dana nakon oplodnje blastocista je djelomično ukopana u endometralnu stromu. Slijedi proliferacija i diferencijacija trofoektodermalnih stanica blastociste pa se razvija unutarnji sloj citotrofoblast (CTB) te vanjski sloj, rani sinciotrofoblast (STB), koji nastaje stapanjem stanica CTB (28). CTB se diferencira u vilozni i ekstravilozni CTB (EVT) (35). Potonji se potom dalje dijeli prema anatomskom smještaju i razini daljnje diferencijacije pa je tako EVT koji invadira endometrij nazvan intersticijskim citotrofoblastom (iCTB) te se smatra presudnim za proces implantacije, dok se onaj koji invadira i remodelira stijenke spiralnih endometralnih arterija naziva endovaskularnim citotrofoblastom (eCTB) i ključan je za pretvorbu spiralnih arterija u uteroplacentarne krvne žile (36).

Postoji još nekoliko podtipova trofoblasta koji se također smatraju važnima za očuvanje trudnoće (37). Upravo je uredna proliferacija i diferencijacija stanica trofoblasta u preciznom vremenskom i prostornom kontekstu presudna za uredan razvoj posteljice. Također, EMT se smatra ključnom za razvoj humane posteljice s obzirom na važnu ulogu koji ima u diferencijaciji trofoblasta te u nastanku bolesti vezanih za trudnoću (35).

Tijekom rane trudnoće ekstravilozni eCTB prilikom prodora i urastanja u decidualne endometralne arteriole prvotno stvara čepove koji sprečavaju nagli dotok majčine krvi pod visokim tlakom u okolinu implantiranog zametka. Potom zamjenjuje sve slojeve arteriola, uključujući mišićni sloj, u cilju remodeliranja odnosno pretvorbe arteriola u uteroplacentarne krvne žile bez mišićnog sloja, zbog čega one gube mogućnost kontrahiranja i ostaju dilatirane čime se plodu osigurava stalni dotok i dovoljno velike količine krvi bogate kisikom i hranjivim tvarima. Neadekvatna invazija rezultira vazokonstrikcijom i suženim lumenom krvnih žila što bitno ograničava uteroplacentarni protok krvi (38–40).

Prvi val invazije ekstraviloznog iCTB događa se između 6. i 8. tjedna gestacije. S obzirom na trofoblastne čepove u arteriolama endometrija, do 10. tjedna smatramo da se razvoj posteljice odvija u hipoksičnim uvjetima. Smisao privremenih trofoblastnih čepova je u tome da se spriječi naglo nadiranje majčine oksigenirane krvi pod visokim tlakom. Izostanak formiranja čepova povezuje se s ranim spontanim pobačajima zbog prenapete hiperoksigenacije (41). Istovremeno, iCTB invadira majčinu deciduu i kontrolira dubinu i vrijeme invazije trofoblasta (41). Rastom parcijalnog tlaka kisika u interviloznom prostoru prestaje proliferacija



i počinje diferencijacija viloznog CTB-a koji se spaja u multinuklearni STB te formira epitelnu barijeru u dodiru s majčinom krvlju kroz koju se transportiraju kisik i hranjive tvari prema plodu. Kako je STB na površini resica u izravnom doticaju s majčinom krvlju, ovaj način placentacije zovemo hemokorionskim. STB ima i endokrinu funkciju jer izlučuje HPL i HCG. Vilozni STB je osjetljiv na hipoksiju te brzo propada, a zamjenjuje ga novi STB koji ponovno nastaje iz stanica CTB-a (28,41).

Osim kisika, postoji niz vrlo važnih regulatora diferencijacije trofoblasta poput citokina i faktora rasta. Bitno je naglasiti da hipoksija aktivira vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *Vascular endothelial growth factor*, VEGF), glikolitičke enzime i dušikov oksid (engl. *Nitric Oxide*, NO) što se pokazalo važnim i u našem istraživanju (42).

Drugi val invazije pojavljuje se između 12. i 14. tjedna gestacije te traje 4 do 6 tjedana, dakle završava oko 20. tjedna gestacije i odvija se u unutarnjoj trećini debljine miometrija. Parcijalni tlak kisika u interviloznom prostoru postepeno raste i s vrijednosti niže od 20 mm Hg prije 8. tjedna, ustaljuje se iza 16. tjedna te je do termina oko 45 mm Hg (27). Čitav proces je precizno prostorno i vremenski reguliran, s obzirom da su prejaka ili preslaba CTB-STB fuzija, preduboka ili preplitka invazija trofoblasta ili pak izostanak pretvorbe spiralnih arteriola povezani s ranim gubitkom trudnoće odnosno spontanim pobačajem ili pak nizom poremećaja u trudnoći kao što su IUGR i preeklampsija (8).

#### **1.1.4. Razvoj korionskih resica i uspostava uteroplacentarnog krvotoka**

Od 8. dana od oplodnje formiraju se unutar trofoblasta šupljine zvane lakune pa govorimo o početku lakunarnog stadija trofoblasta koji traje do 13. dana. Kako sinciciotrofoblast razgrađuje stijenke površinskih endometralnih krvnih žila, majčina krv se počinje izljevati u lakune. Spajanjem lakuna unutar sinciciotrofoblasta sa endometralnim kapilarama u koje urasta, stvaraju se sinusoide iz kojih će se kasnije razviti intervilozni prostor. Između 10. i 11. dana nakon oplodnje čitava blastocista se ukopala u endometriju (28). Od 13. do 15. dana razvija se korionska ploča iz koje izlaze posteljične resice prema lakunama te budućem interviloznom prostoru gdje se granaju u manje ogranke. Rani vilozni razvoj se odnosi na vrijeme od 13. do 28. dana nakon oplodnje kada urastanjem CTB-a u tračke STB-a, koji se nalaze između lakunarnih prostora nastaju primarne posteljične resice zvane i usidrene resice (engl. *Anchoring*

villi). Stroma resica razvija se iz izvanembrionalnog mezoderma, a njezinim urastanjem u primarne resice nastaju sekundarne resice. Od 16. do 20. dana započinje vaskulogeneza te se formira primitivna krvožilna mreža u izvanembrionalnom mezodermu. Spajanjem krvožilne mreže embrionalnih ovojnica s onima zametka uspostavlja se embrioplacentarni krvotok.

Razvoj krvnih žila u posteljičnim resicama je također prostorno i vremenski usklađen. Tako se u korionskim resicama iz ekstraembrionalnog mezoderma pod utjecajem VEGF-a iz trofoblasta razvijaju krvne kapilare u resicama, čime nastaju primitivne tercijarne resice. U spomenutom procesu osim VEGF-a sudjeluje još niz drugih faktora poput PIGF-a (engl. *Placental growth factor*), PDGF-a (engl. *Platelet-derived growth factor*), FGF-a (engl. *Fibroblast growth factor*), TGF-a (engl. *Transforming growth factor*), TNF-a (engl. *Tumor necrosis factor*) i još mnogih drugih. Važno je ponovno istaknuti da ekspresiju VEGF-a i PIGF-a uz spomenute faktore regulira i hipoksija (43,44).

Placentarna vaskulogeneza i angiogeneza (proces remodeliranja postojećih krvnih žila) ključne su za razvoj i dozrijevanje posteljičnih resica (27,30). Od 5. tjedna gestacije usporedno s vaskulogenezom u posteljici započinje angiogeneza koja se odvija do kraja trudnoće. Razvijene krvne žile u resicama omogućavaju izmjenu plinova i hranjivih tvari između majke i ploda te između majčine i fetalne krvi postoje 4 sloja: endotel krvne žile resice, ekstraembionalni mezoderm te sloj cito i sinciotrofoblata, što se sve zajedno naziva uteroplacentarnom membranom. Poremećaj u razvoju krvnih žila posteljičnih resica dovodi do poremećaja u trudnoći kao što su IUGR i preeklampsija (27,28).

Osim površine i debljine uteroplacentarne membrane, za djelotvornu izmjenu tvari važni su i uteroplacentarni protok krvi te volumen interviloznog prostora. Upravo zbog toga je uteroplacentarni krvotok vrlo intenzivan u trudnoći. Prije trudnoće je protok krvi kroz spiralne arterije 100 ml/min, dok je u terminskim uteroplacentarnim krvnim žilama oko 500 ml/min (45).

Iz tercijarnih resica se razvijaju mezenhimalne resice koje su preteča svih ostalih oblika resica: nezrelih intermedijarnih, zrelih intermedijarnih, matičnih i terminalnih resica (46). Nezrele i zrele intermedijarne resice preteča su zrelih oblicima resica. Tijekom trudnoće stanice trofoblata u posteljičnim resicama proliferiraju, diferenciraju se te odumiru apoptozom u nizu vrlo dinamičnih i dobro usklađenih procesa kojima je svrha rast posteljice u ranoj te

obnova i remodeliranje korionskih resica u kasnijim fazama trudnoće zbog prilagodbe rastućim potrebama ploda. Do 8. tjedna gestacije posteljica dobiva konačni morfološki izgled, nakon čega slijedi rast grananjem tercijarnih resica te će sve resice koje se kasnije razvijaju biti podrazredi tercijarnih resica (27).

U jednom oblikovanim krvnim žilama resica naknadna vaskularizacija se odvija u dva razdoblja. Prvo je razdoblje granajuće angiogeneze koje traje do 25. tjedna gestacije, na koje se nastavlja razdoblje negranajuće angiogeneze koje traje sve do kraja trudnoće (47). Fetalna krv dopijeva u resice kroz dvije umbilikalne arterije koje se granaju u sve manje krvne žile te se drenira preko vena u jednu umbilikalnu venu.

Tlak krvi u fetalnim krvnim žilama je uvijek viši nego u intervioznom prostoru, jer bi u suprotnom kolabirale. Između 80 i 100 uteroplacentarnih krvnih žila, koliko ih ukupno ima, se otvara u intervilozni prostor te krv iz njih oplakuje resice. Svaka fetomaternalna cirkulatorna jedina se sastoji od jednog stabla resica sa središnje smještenim interviloznim prostorom, a naziva se posteljični lobul (48).

Pred kraj trudnoće dolazi do zadebljanja bazalne lamine endotela krvnih kapilara, povećanja udjela vezivnog tkiva u stromi i taloženja fibrina na vanjskoj površini posteljičnih resica što posljedično uzrokuje smanjenje izmjene tvari između majke i ploda. Zato je važno istaknuti da posteljica ima veliki rezervni kapacitet. Naime, kad je i do 30% resica obloženo fibrinom, to još ne mora imati nikakve negativne reperkusije na funkciju posteljice (27,28).

Bitno je napomenuti da i kod uredno razvijene posteljice pod utjecajem različitih patoloških stanja može doći do ispada posteljične funkcije te gubitka rane trudnoće, nastanka IUGR-a, intrauterine smrti ploda ili prijevremenog porođaja. To se može dogoditi primjerice u slučaju vilitisa, infarkta u krvnim žilama posteljice, kod kroničnog prijevremenog djelomičnog odlijepljenja posteljice (abrupcije) ili drugih patoloških stanja koja mogu kompromitirati funkciju posteljice (49).

## **1.2. INTRAUTERINI ZASTOJ RASTA**

### **1.2.1. Fetalni rast**

Uredan rast ploda je rezultat normalnog razvoja i funkcije posteljice, cjelokupnog zdravstvenog stanja majke, njezinih prehrambenih i drugih navika, genske osnove fetusa te međudjelovanja brojnih okolišnih faktora (50,51).

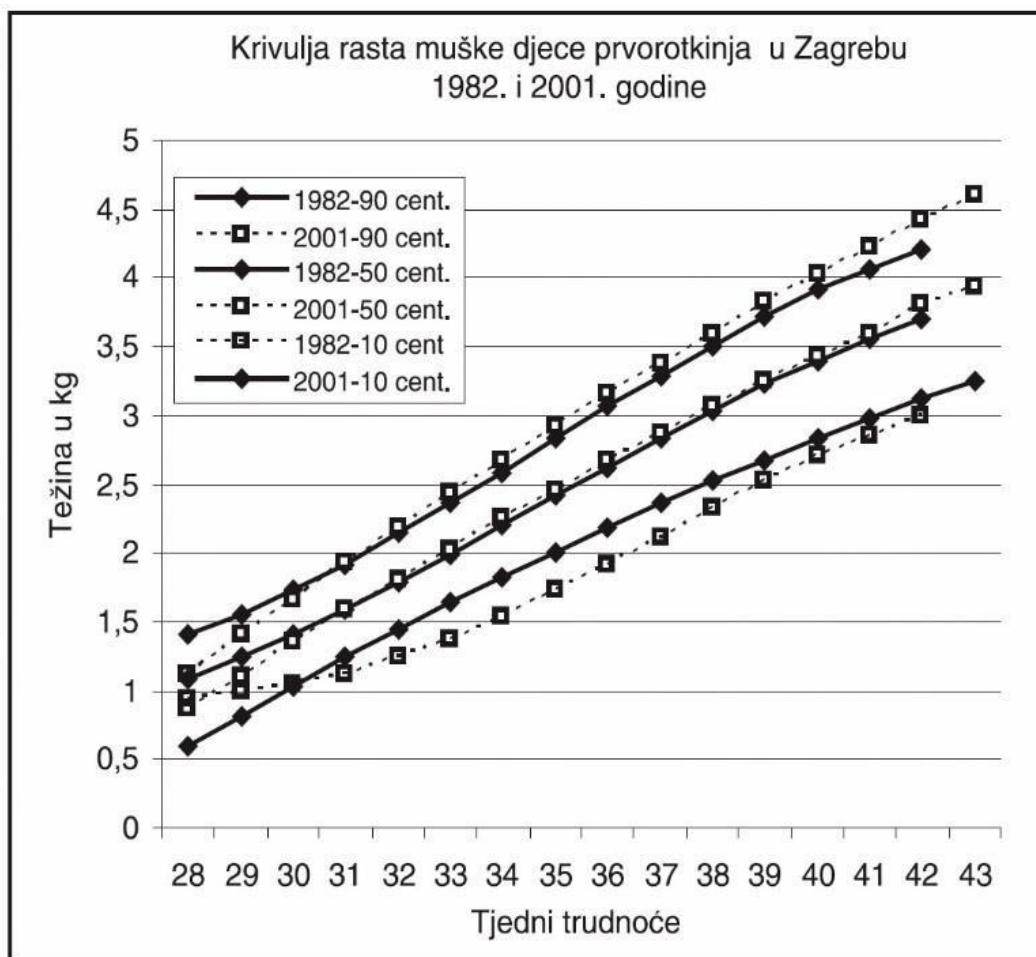
Vrijeme od začeća do rođenja se smatra najbržim i najintenzivnijim razdobljem rasta čovjeka (27). Prirast tjelesne mase ploda tijekom trudnoće ima svoju dinamiku pa tako oko 15. tjedna gestacije iznosi 5 g dnevno, oko 24. tjedna 15 - 20 g dnevno, a oko 34. tjedna iznosi čak 30 - 35 g dnevno (52). Navedena dinamika rasta ploda se objašnjava tako što je prvo tromjesečje obilježeno intenzivnom diobom i posljedično povećanjem broja stanica tijekom organogeneze, dakle hiperplazijom stanica.

Oko 20. tjedna osim hiperplazije pojačava se hipertrofija stanica, a razdoblje nakon 32. tjedna gestacije obilježeno je intenzivnom hipertrofijom stanica (53). Tako je vrijeme nakon 32. tjedna pa sve do kraja trudnoće ujedno i vrijeme akumulacije većine fetalnog masnog tkiva kada plod ubrzano dobiva na tjelesnoj masi (52). No, već oko 36. tjedna gestacije na posteljici se javljaju regresivne promjene koje će dovesti do usporavanja fetalnog rasta nakon 38. tjedna gestacije (27).

### **1.2.2. Krivulje fetalnog rasta**

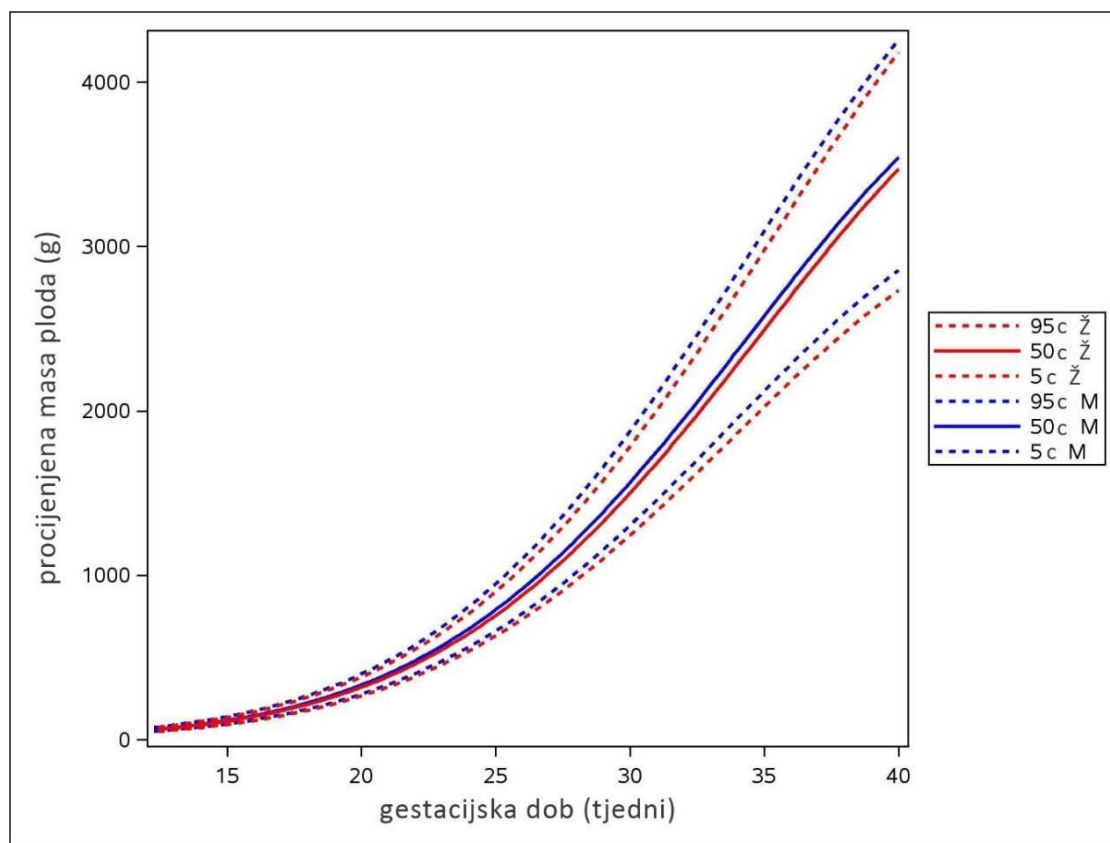
Za procjenu fetalnog rasta koriste se centilne krivulje temeljem kojih se fetalna masa procjenjuje kao normalna u rasponu između 10. i 90. centile za gestacijsku dob te su to fetusi uredne mase, odnosno eutrofični. Fetusi kao i novorođenčad procijenjene, odnosno porođajne mase ispod 10. centile su hipertrofični, dok su oni iznad 90. centile za gestacijsku dob hipertrofični. Da bi se rast ploda mogao objektivno procijeniti i usporediti sa standardnim za svoju populaciju, izrađene su brojne centilne krivulje različitih populacija za ultrazvučnu (UZV) procjenu fetalne mase te mase djeteta vaganog nakon porođaja, a u odnosu na njegovu gestacijsku dob. Razlog za to su uočene razlike među različitim populacijama i rasama, odnosno

njihov različiti genski potencijal za rast. Stoga se javila bojazan da bi se zbog toga IUGR mogao pogrešno i prekomjerno dijagnosticirati, uzrokujući time nepotrebne preglede i zdravstvene intervencije, prekomjerni stres u trudnica i opterećenje zdravstvenog sustava (54). Osim toga, uočeno je da muška djeca imaju za 150 g veću masu od ženske, te da je tjelesna masa djece višerotki veća 100 - 150 g od mase djece prvrotki (55). Pokazano je i da majčini geni utječu na masu ploda znatno više od očevih, te da žene koje i same imaju veću tjelesnu masu rađaju djecu veću porođajne mase (50,51). Zbog svega navedenoga danas postoji niz različitih krivulja fetalnog rasta koje su napravljene u nastojanju da odgovaraju ciljanim populacijama i njihovim specifičnostima. U Hrvatskoj je tako prva krivulja fetalnog rasta učinjena još 1982. godine u Zagrebu, a sveukupno ih je do sada imamo četiri; u Zagrebu, Rijeci i Splitu te nisu pokazale značajne regionalne razlike (55) (Slika 3). Ipak, do sada još nije učinjena jedinstvena nacionalna krivulja rasta koja bi se standardno koristila u Hrvatskoj.



**Slika 3.** Krivulja fetalnog rasta muške djece u prvrotki u Zagrebu 1982. i 2001. te njihova usporedba s prikazom na 90., 50. te 10. centili (55).

Unatoč razlikama koje su uočene među različitim populacijama ili baš zbog njih, od 2009. do 2014. godine provedena je međunarodna multicentrična i multietnička studija (engl. *International fetal and newborn consortium for the 21st century*, INTERGROWTH-21st) s ciljem međunarodne standardizacije krivulja fetalnog rasta te rasta i razvoja u ranom djetinjstvu, sve do 5. godine života djeteta. U tom su cilju prikupljeni i obrađeni podaci iz osam geografski posve različitih urbanih populacija (Brazil, Kina, Indija, Italija, Kenija, Oman, Britanija, SAD) te je suprotno dotadašnjim istraživanjima utvrđeno da je u zdravih i uredno uhranjenih trudnica u nisko rizičnim trudnoćama rast djece vrlo sličan bez obzira na rasu i etničku pripadnost trudnice (56). Na temelju tih dobivenih rezultata su u Longitudinalnoj studiji fetalnog rasta (engl. *Fetal growth Longitudinal study*, FGLS) izrađene međunarodne standardizirane fetalne krivulje koje je Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) preporučila kao standardizirane međunarodne krivulje fetalnog rasta (57) (Slika 4).



**Slika 4.** Prikaz krivulja fetalnog rasta prema WHO-u sa usporedbom između ženskih (Ž) i muških (M) fetusa za hipertrofe (95. centila), uredan rast (50. centila), te hipotrofe (5. centila). c - centila. Preuzeto i preuređeno iz (56).

Ipak, i dalje se koriste različite krivulje fetalnog rasta, kao što je primjerice ona po Hadlock-u koja je također jedna od međunarodno najčešće korištenih. Osim toga, stavovi vezano za korištenje standardiziranih međunarodnih krivulja također još nisu jednoglasni. Primjerice, jedna od novijih studija koja je procjenjivala upravo uporabu standardiziranih INTERGROWTH-21 krivulja u europskim zemljama ne zagovara korištenje istih za europsku populaciju jer upozorava da bi s obzirom na velika antropomorfna odstupanja među europskim populacijama moglo doći do podcjenjivanja broja hipotrofa za gestacijsku dob (58).

Osim toga, uočeno je da bez obzira jesu li korištene INTERGROWTH-21, WHO ili krivulje prema Hadlock-u, učinak procjene koji će plodovi imati nepovoljan perinatalni ishod ostaje sličan. Naime, pokazano je da sve spomenute centilne krivulje imaju nisku osjetljivost i pozitivnu prediktivnu vrijednost te da neće prepoznati više od 70% plodova na kraju pogođenih perinatalnim morbiditetom ili mortalitetom, odnosno da su slabi prediktori ranog neonatalnog nepovoljnog ishoda (59). Zato se spomenute krivulje koriste samo kao dio alata za procjenu rizika za IUGR odnosno procjenu rizika za nepovoljan perinatalni i neonatalni ishod te uz njih imamo na raspolaganju i korištenje drugih pokazatelja fetalne kondicije osim procjene mase, a o kojima će više biti govora u daljnjem tekstu. Tako će tek kombinacija svih alata i kontinuirano praćenje trudnoće dati najvjerodostojniju procjenu fetalne kondicije i mogućih rizika.

### **1.2.3. Definicija i dijagnoza zastoja fetalnog rasta**

Intrauterini zastoj rasta (engl. *Intrauterine growth restriction*, IUGR ili *Fetal growth restriction*, FGR) označava nemogućnost ploda da ostvari svoj puni genetski potencijal za rast te se svrstava u jedan od najvažnijih poremećaja u trudnoći s obzirom da uzrokuje značajno povišenje perinatalnog i neonatalnog morbiditeta i mortaliteta. Fetusi opterećeni IUGR-om imaju pet do deset puta veći rizik od intrauterine smrti. Osim toga, pokazano je da je nakon prijevremenosti IUGR drugi po učestalosti uzrok dojenačkog mortaliteta (60). Nadalje, djeca rođena sa IUGR-om imaju slabije kognitivne sposobnosti u odnosu na djecu rođenu iz urednih trudnoća te osim toga imaju i povećan rizik za razvoj neurorazvojnih poremećaja (61). Također, sve više dokaza govori u prilog teoriji da bi IUGR mogao biti preteča brojnih kroničnih bolesti u odrasloj dobi kao što su dijabetes, bolest koronarnih arterija, hipertenzija, dislipidemija i kronična bubrežna bolest (62).

Prema ACOG-u (engl. *American College of Obstetricians and Gynecologists*) i SMFM-u (engl. *Society for Maternal-Fetal Medicine*) se dijagnoza IUGR-a temelji na ultrazvučnoj procjeni mase ploda (engl. *Estimated fetal weight, EFW*) ispod 10. centile za gestacijsku dob te spol ploda prema utvrđenim krivuljama fetalnog rasta (6). Ultrazvučna procjena mase ploda se temelji na ultrazvučnom mjerenju biparijetalnog promjera glave (engl. *Biparietal diameter, BPD*), opsega glave (engl. *Head circumference, HC*), opsega abdomena (engl. *Abdominal circumference, AC*) te duljine bedrene kosti (engl. *Femoral length, FL*). Osim gore navedene EFW ispod 10. centile, dijagnoza IUGR-a se također prema ACOG-u može postaviti i na temelju ultrazvučne procjene izmjerene samo AC ispod 10. centile za gestacijsku dob o čemu će više govora biti u nastavku (63,64).

IUGR se smatra kompleksnom opstetričkom dijagnozom oko koje postoji još dosta nedorečenosti, s obzirom na manjak konsenzusa u struci vezano za dijagnostičke kriterije, etiologiju, praćenje takvih trudnoća te napose vezano za optimalno vrijeme porođaja (63).

Uz sve navedeno, dodatni izazov vezano za dijagnosticiranje IUGR-a je u tome da se uspije prepoznati koji su plodovi manji od 10. centile za gestacijsku dob, a da su zapravo ostvarili svoj puni genetski potencijal rasta te su stoga tek konstitucijski manji u odnosu na većinu plodova svoje gestacijske dobi (engl. *Small for gestational age, SGA*). To je bitno stoga što ti plodovi, unatoč tome što su masom ispod 10.c. za gestacijsku dob, zapravo nemaju povećan fetalni i neonatalni morbiditet i mortalitet (65).

Smatra se da bi čak do 70% fetusa s masom ispod 10. centile ustvari moglo pripadati upravo toj grupi (66). Ipak, koji će fetusi biti SGA, a koja doista imati IUGR nije moguće odrediti bez adekvatnog praćenja. Stoga su za sprečavanje nepovoljnog ishoda trudnoće te dobar dugoročni ishod i prognozu djece s IUGR-om ključni pravodobna i ispravna dijagnoza, adekvatan nadzor nad trudnoćom opterećenom IUGR-om, kao i pravodobni porođaj uz mogućnost adekvatnog ranog zbrinjavanja novorođenčeta s obzirom na povećani rizik od fetalnog i neonatalnog morbiditeta i mortaliteta.

Za ispravno postavljanje dijagnoze odsudno je pravilno određivanje trajanja trudnoće odnosno gestacijske dobi djeteta na temelju anamnestičkog podatka o prvom danu zadnje menstruacije (engl. *Last menstrual period, LMP*) te u skladu s dobivenom informacijom, ultrazvučno mjerenje duljine tjeme-trtica ploda (engl. *Crown-rump length, CRL*) u prvom



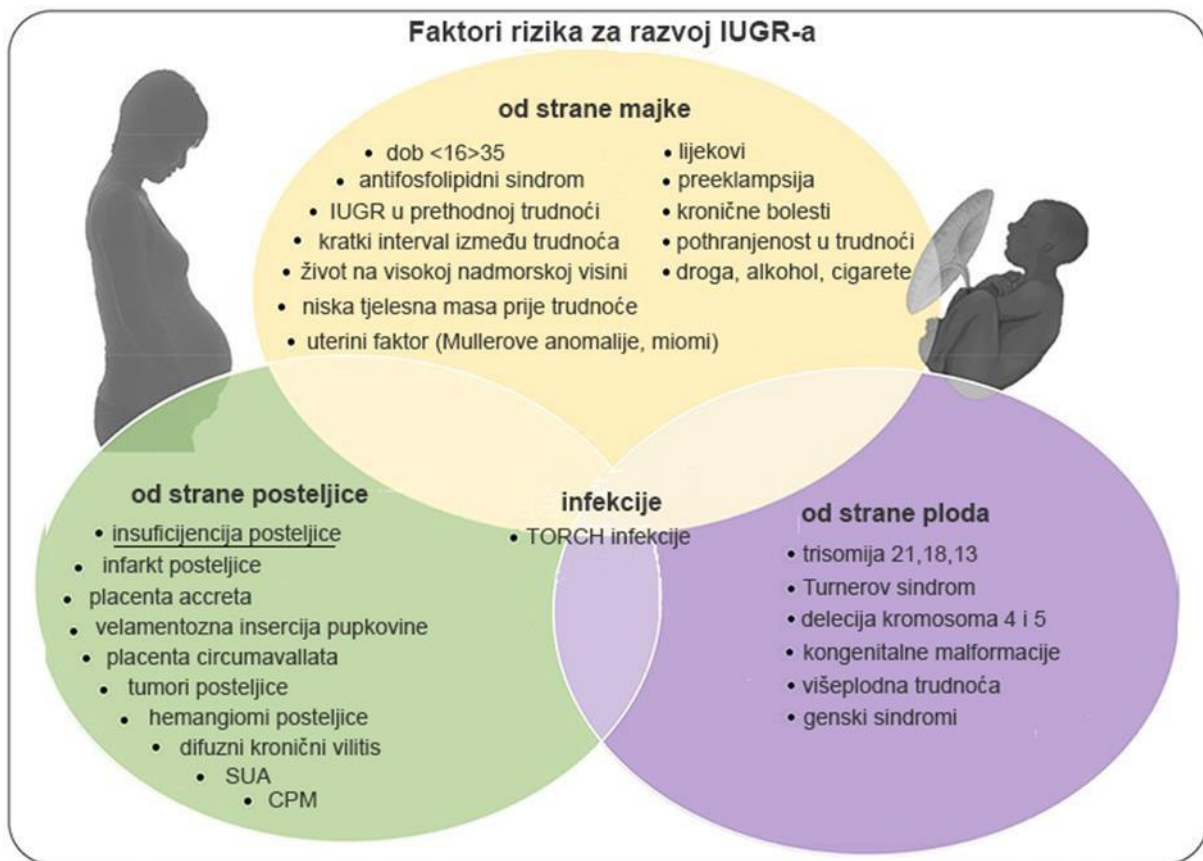
tromjesečju. Ako se LMP i CRL razlikuju za 5 dana prije navršenog 9. tjedna gestacije, te 7 dana između 9. i 14. tjedna, potrebno je korigirati trajanje trudnoće odnosno gestacijsku dob ploda prema CRL-u (52).

Incidencija IUGR-a ovisi o referentnim krivuljama fetalnog rasta (67). Velika međunarodna studija INTERGROWTH-21st je pokazala veću incidenciju IUGR-a u zemljama u razvoju u nego u razvijenim zemljama. Naime, gotovo je 20% živorođene djece u zemljama u razvoju porođajne mase ispod 10. centile, u odnosu na oko 10% u razvijenim zemljama. Osim toga, čak 22% neonatalne smrtnosti u zemljama u razvoju otpada upravo na djecu tjelesne mase ispod 10. centile za gestacijsku dob (5,68).

S obzirom na moguće teške posljedice za plod, brojnim se istraživanja pokušalo otkriti može li se prevenirati IUGR. Pokušalo se s dijetetskim mjerama, dodacima prehrani koji bi pomogli u povećanju rasta ploda, pojačanim mirovanjem trudnice, terapijom kortikosteroidima, antihipertenzivima, antikoagulantnom terapijom te primjenom plazma ekspandera, no ništa od navedenoga nije spriječilo nastanak i smanjilo incidenciju IUGR-a (69,70). Ipak, potrebno je naglasiti da se niske doze acetilsalicilne kiseline daju preventivno kod trudnica s visokim rizikom za razvoj preeklampsije čime dolazi i do smanjenja učestalosti IUGR-a u tim trudnoćama s obzirom da se kod preeklampsije, naročito teških oblika, češće javlja IUGR (71).

#### **1.2.4. Etiologija i faktori rizika**

Poznajemo mnoge faktore rizika za razvoj IUGR-a, te ih dijelimo na one od strane majke, ploda, ili pak posteljice, a često se ti mogući uzroci IUGR-a međusobno preklapaju pridonoseći kompleksnosti ovog poremećaja (Slika 5). IUGR je stoga heterogeni poremećaj, kako u svojoj raznolikoj, često kompleksnoj etiologiji, tako i u rasponu kliničkih slika od blagog do težeg i napose teškog zastoja. Sukladno tome, različit je i perinatalni te neonatalni ishod te optimalan ritam praćenja takvih trudnoća, koji će biti diktiran praćenjem stanja i kondicije ploda.



**Slika 5.** Faktori rizika za nastanak IUGR-a od strane majke, posteljice i ploda za razvoj IUGR-a. Uređeno prema predlošku (72). CPM, Confined placental mosaicism; SUA, Single umbilical artery.

#### 1.2.4.1. Faktori rizika za nastanak IUGR-a od strane majke

Osim anamnestičkog podatka o LMP, anamneza i povijest bolesti trudnice su ključni za utvrđivanje povišenog rizika za IUGR te potrebe za pojačanim praćenjem trudnoće, jer dobivamo uvid u majčine bolesti i navike koje mogu biti povezane s nastankom IUGR-a.

Tako se može od početka trudnoće pojačano nadzirati trudnoću u žena s povišenim rizikom za razvoj IUGR-a i smanjiti mogućnost nepovoljnog perinatalnog ishoda, te ako je moguće, rano prepoznati i otkloniti uzrok nastanka IUGR-a. Osim toga, jedan od rizičnih faktora za IUGR u sadašnjoj trudnoći je upravo IUGR u prethodnoj trudnoći, s obzirom na to da je rizik od ponovljenog IUGR-a čak 25% (73).

Majke nižeg socioekonomskog statusa, te one u zemljama u razvoju s lošijom prenatalnom skrbi imaju povišen rizik od IUGR-a (74). Osim toga, pothranjenost majke prije trudnoće te dnevni kalorijsku unos ispod 1500 kilokalorija u trudnoći, ili život na visokoj nadmorskoj visini te kratak interval između trudnoća također utječu na učestalost pojave IUGR-a (75). Osim toga, brojne kronične bolesti u trudnica mogu značajno utjecati na pojavu IUGR-a, pa je tako učestaliji kod žena sa kroničnom hipertenzijom, dijabetesom, kroničnim bubrežnim ili plućnim bolestima, ulceroznim kolitisom, Chronovom bolešću te antifosfolipidnim sindromom.

Osim toga, IUGR se češće javlja kod trudnica s preeklampsijom, kako je ranije već napomenuto. Nadalje, lijekovi koje trudnica uzima zbog svoje osnovne bolesti mogu značajno utjecati na fetalni rast (beta blokatori, antikonvulzivi i dr.). Pušenje u trudnoći, baš kao i zlouporaba različitih droga i alkohola mogu biti rizični faktor za pojavu IUGR-a. Mullerove anomalije maternice su također mogući uzrok nastanka IUGR-a. U literaturi se može naći i da su infertilitet i tehnike asistirane reprodukcije (engl. *Artificial reproductive techniques*, ART) neovisni faktor rizika za IUGR (76,77). Ipak, druga istraživanja osporavaju nepovoljan utjecaj ART-a na rast ploda pružaju dokaze o potpuno urednom rastu ploda (78,79).

#### **1.2.4.2. Faktori rizika za nastanak IUGR-a od strane ploda**

U oko 10% djece uzrok IUGR-a su kongenitalne anomalije te je stoga detaljan ultrazvučni pregled fetalnih struktura (engl. *Anomaly scan*) vrlo važan za određivanje uzroka i mogućeg nastanka IUGR-a (80). Najčešće anomalije koje se javljaju uz IUGR su defekti trbušnog zida (gastroshiza ili omfalokela), dijafragmalna hernija, skeletna displazija te neke kongenitalne srčane greške. Osim toga, genske i kromosomske anomalije mogu biti uzrok nastanka IUGR-a u čak 5 - 20% slučajeva. IUGR se javlja s trisomijom 21. (Downov sindrom), trisomijom 18. (Edwardsov sindrom) te trisomijom 13. kromosoma (Patau sindrom). Javlja i s delecijama kromosoma 4 (Wolf–Hirschhornov sindrom) i 5 (Cri du chat sindrom) te u različitim genskim sindromima. Infekcije u trudnoći - TORCH, uzrok su IUGR-a u oko 5% slučajeva, a najčešće se od njih u razvijenim zemljama kao uzrok IUGR-a javlja infekcija citomegalovirusom (CMV). Učestalija pojavnost IUGR-a uočena je i u višeplođnim trudnoćama (76).

### 1.2.4.3. Faktori rizika za nastanak IUGR-a od strane posteljice

Najčešći uzrok IUGR-a u strukturno i kromosomski zdravih plodova, koji obično uzrokuje asimetrični tip IUGR-a, je uteroplacentarna insuficijencija (7). Naime, abnormalna placentacija i placentna vaskularna bolest dovode do uteroplacentarne insuficijencije, kronične hipoksije i razvoja IUGR-a (9). Upravo je stoga to i predmet našeg istraživanja.

Osim toga, u oko 10% slučajeva IUGR-a u kojih se prvotno ne identificira uzrok, patohistološkim pregledom posteljice nađe se ograničeni mozaicizam posteljice (engl. *Confined placental mosaicism*, CPM). Naime, u takvim je posteljicama povećana učestalost decidualne vaskulopatije i infarkta djela posteljice pa je time kompromitirana i njezina funkcija te dolazi do IUGR-a (81,82).

Nadalje, bitno je ponovno istaknuti da i kod uredno razvijene posteljice pod utjecajem različitih patoloških stanja može doći do ispada posteljične funkcije i posljedičnog nastanka IUGR-a. Tako će primjerice u slučaju infarkta u krvnim žilama posteljice doći do ispada funkcije toga djela posteljice ili pak ako dođe do kroničnog prijevremenog odlijepljenja djela posteljice (abrupcije). Funkcija posteljice može biti kompromitirana i u slučaju hemangioma ili tumora u području posteljice, ili pak kod upalnih stanja kao što je kronični vilitis (49).

Povišen rizik od nastanka IUGR-a pojavljuje se i u slučaju placente circumvallate u koje može biti značajno smanjena korionska ploča te kod placente accrete i placente previje (72,83). Treba istaknuti da i velamentozna insercija pupkovine te postojanje samo jedne umbilikalne arterije u pupkovini (engl. *Single umbilical artery*, SUA) također mogu dovesti do nastanka IUGR-a (72).

Zbog svega navedenoga, pregled posteljice od strane patologa nakon porođaja djeteta s IUGR-om je vrlo važan, obzirom da se tako dobiva uvid u stanje posteljice te moguće uzroke IUGR-a (infarkti, znakovi upale i sl.) te se time prikupljaju mogući važni podaci za planiranje nove trudnoće.

Ipak, unatoč brojnim poznatim uzrocima i faktorima rizika, u čak oko trećine slučajeva IUGR je i dalje nepoznate etiologije (84).

### 1.2.5. Patofiziologija i vrste IUGR-a

Središnji problem kod IUGR-a je kompromitirana opskrba ploda kisikom i hranjivim tvarima uslijed placentarne insuficijencije. Ona nastaje, kako je već ranije objašnjeno, kao posljedica poremećaja invazije EVT u endometralne spiralne arterije te izostanka njihove pretvorbe u uteroplacentarne krvne žile, jer tada dolazi do smanjenog volumena krvi u interviloznom prostoru koji s vremenom ne može zadovoljiti potrebe rastućeg ploda. Placentarna insuficijencija može se javiti i uslijed poremećaja sazrijevanja posteljinih resica, redukcije interviloznog prostora i dr. Kod uredno razvijene posteljice također može doći do nastanka insuficijencije uzorkovane različitim patološkim stanjima poput vilitisa, tromboze, taloženja fibrina i sl. Sva ta stanja kompromitiraju puni opseg rada posteljice te ovisno o svojem intenzitetu mogu uzrokovati IUGR.

Napredovanjem trudnoće rastu potrebe ploda za kisikom i hranjivim tvarima jer je to doba najintenzivnijeg rasta, zbog čega je potrebna stalna prilagodba posteljice tim rastućim potrebama. Insuficijentna posteljica ne može pratiti potrebe fetusa što rezultira nutritivnom insuficijencijom posteljice s posljedičnim razvojem kasnog, asimetričnog IUGR-a koji čini 70-80% svih IUGR-a. Ovaj se oblik IUGR-a javlja nakon 32. tjedna gestacije kada su fetalne potrebe u najvećem porastu jer je to vrijeme najintenzivnijeg porasta mase ploda. Kod ovog tipa IUGR-a su BPD i HC urednih vrijednosti za gestacijsku dob, FL može tek nešto zaostajati, no najviše zaostaje AC. Upravo se zato dijagnoza asimetričnog IUGR-a može postaviti na temelju ultrazvučne procjene izmjerene AC ispod 10. centile za gestacijsku dob, pa je tako i ACOG priznaje kao dijagnostički kriterij za IUGR, kako je ranije već napomenuto (63,64).

S obzirom na smanjen dotok hranjivih tvari fetus pokušava nadoknaditi i očuvati energiju kako bi povećao svoje izgleda za preživljenje. Dolazi do smanjenja ukupne tjelesne masti (engl. *Total body fat*) te smanjenja zaliha glikogena u jetri, što se najbolje može uočiti smanjenjem fetalne AC. Naime, preusmjeravanjem odnosno centralizacijom krvotoka fetus pokušava osigurati i očuvati rast i razvoj ključnih struktura (mozak, srce, nadbubrežna žlijezda) - što se naziva i efekt poštede mozga (engl. *Brain sparing effect*). Stoga se upravo AC smatra najpouzdanijim biometrijskim pokazateljem IUGR-a (85) što je i potvrđeno s obzirom da je upravo u fetusa u kojih je AC ispod 5. centile za gestacijsku dob nađena učestalija fetalna hipoksija i acidemija u odnosu na fetuse urednog AC iste gestacijske dobi (86).

Nadalje, centraliziranjem krvotoka dolazi do smanjenja protoka krvi kroz bubrege, što posljedično dovodi do smanjene diureze i smanjenja količine plodove vode, odnosno, oligohidramnija. Uslijed prilagodbi fetusa na nepovoljne uvijete dolazi i do smanjenja mišićne mase te sniženja sadržaja minerala u kostima. Fetus počinje reducirati broj i kvalitetu svojih pokreta što je vidljivo pri ultrazvučnom mjerenju biofizičnog profila. U kroničnoj hipoksiji ubrzava se sazrijevanje fetalnih pluća i povećana je proizvodnja eritrocita (87,88).

Ako se IUGR razvije tijekom rane trudnoće, u vrijeme intenzivne hiperplazije stanica, svi će organi, a posljedično i ultrazvučne mjere ploda biti proporcionalno smanjeni što će se očitovati simetričnim tipom IUGR-a na koji otpada 20 - 30% svih slučajeva IUGR-a. Stoga, simetrični zastoj u rastu ploda obično znači da je patološki proces koji je doveo do zastoja nastupio rano u trudnoći i da je u ranom razvoju došlo do smanjene opskrbe ploda hranjivim tvarima. Najčešće nastaje kao posljedica kromosomopatija ploda, kongenitalnih infekcija u ranoj trudnoći i sl. (89). S obzirom na povećanu učestalost aneuploidija u simetričnom IUGR-u, rano uočavanje zaostajanja u rastu preporuka je za kariotipizaciju ploda (90).

Osim asimetričnog i simetričnog oblika, postoji također i mješoviti tip zastoja, koji je obično prisutan u zemljama u razvoju i odlikuje se, kako mu i ime govori, karakteristikama oba ranije opisana tipa IUGR-a (91).

### **1.2.6. Praćenje trudnoće s IUGR-om**

U IUGR-u je potrebno pojačano praćenje ponavljanim, serijskim ultrazvučnim mjerenjima gdje se prati dinamika dobivanja na masi ploda, biofizični profil ploda (engl. *Biophysical profile*, BPP) te doplerska mjerenja protoka u pojedinim krvnim žilama, prije svega u umbilikalnoj arteriji (lat. *Arteria umbilicalis*, AU), ali i u središnjoj moždanoj arteriji (lat. *Arteria cerebri media*, ACM) te napose u venoznom duktusu i umbilikalnoj veni (92).

Ne postoji konsenzus i jasne smjernice o optimalnom broju ultrazvučnih pregleda u trudnoći. Broj pregleda, njihov vremenski razmak i vrsta određuju se individualno, prema potrebama ploda na temelju ranijih ultrazvučnih nalaza. Ipak, UZV pregled u kojem je poželjno učiniti detaljan pregled fetalnih organa i organskih sustava (engl. *Anomaly scan*) preporučuje se između 18. i 22. tjedna gestacije. Osim toga, postoji i preporuka UZV pregleda oko 32. te 36.

tjedna zbog praćenja fetalnog rasta u zadnjem tromjesečju kada se očekuje najintenzivniji prirast mase ploda (93).

Kako je već navedeno, rani IUGR može biti češće povezan s aneuploidijom, te je uputno učiniti kromosomsko testiranje ploda. Osim toga, SMFM preporučuje kromosomsko testiranje bez obzira na gestacijsku dob u kojoj je uočen IUGR ako se ultrazvučnim pregledom, napose UZV probirom na anomalije ploda, postavi sumnja na strukturnu anomaliju ploda ili ako su vidljivi neki od markera za kromosomopatije poput ciste koroidnog pleksusa ili zadebljanje nuhalnog nabora. Ako se uz IUGR prati i povećana količina plodove vode (polihidramnij), povećana je sumnja u trisomiju 18 ploda te je također indiciran probir na kromosomopatije (63,94).

Biofizikalnim profilom procjenjujemo fetalnu kondiciju, jer je on odraz fetalnog acido-baznog statusa. Ultrazvučnim pregledom se traže i procjenjuju pokreti i tonus ploda, pokreti disanja te količina plodove vode (engl. *Amniotic fluid index*, AFI). Osim spomenutih ultrazvučnih parametara postoji i peta komponenta biofizikalnog profila, a to je kardiokotografski zapis (engl. *Cardiotocography*, ctg) u mirovanju (engl. *non-stress test*, NST). Svaki od procijenjenih parametara se ocjenjuje s najviše 2 boda, što za ultrazvučne parametre daje zbroj od najviše 8, a kada ubrojimo i NST najviše 10 bodova. Tako je rezultat ukupnog zbroja u BPP-u odraz stanja, odnosno kondicije fetusa (95).

BPP i NST su pouzdani testovi za procjenu stanja ploda te je intrauterina smrt unutar tjedan dana od urednih rezultata BPP-a i NST-a vrlo rijetka (96). Upravo se zato ovi testovi preporučuju za redovito praćenje fetusa s IUGR-om. Nalazi doplerskih mjerenja će nalogati učestalost provođenja NST-a i BPP-a. Tako će se u slučaju odsutnog ili obrnutog dijastoličkog protoka u AU s obzirom na slabljenje fetalnih kompenzacijskih mehanizama, a prema dnevnim provjerama BPP-a i NST-a i ovisno o gestacijskoj dobi, razmatrati dovršenje trudnoće.

U trudnoćama u kojima je etiologija IUGR-a vezana za posteljičnu insuficijenciju, doplerska mjerenja, naročito u AU, preporučeni su način praćenja ploda jer se njima može pratiti uteroplacentarni krvotok odnosno obliteracija posteljične vaskulature, s obzirom da će ispadi posteljične vaskulature dovesti do promjena u fetalnoj hemodinamici. Doplersko mjerenje brzine protoka krvi (engl. *Doppler velocimetry*) u AU smatra se jednim od najvažnijih postupaka u nadzoru ploda s IUGR-om, jer je utvrđeno da dobro korelira sa stanjem ploda te

da može smanjiti perinatalni morbiditet i mortalitet i odgoditi nepotrebni jatrogeni prijevremeni porođaj, smanjiti učestalost nepotrebnih indukcija porođaja i carskog reza, što je potvrđeno i PORTO studijom (engl. Prospective Observational Trial to Optimize Pediatric Health in Intrauterine Growth Restriction) (97,98).

Naime, ranije navedeni mnogobrojni uzroci od strane majke i posteljice mogu dovesti do obliteracije krvnih žila u posteljičnim resicama što dovodi do povećanog otpora u krvnim žilama posteljice i rezultira progresivnim smanjenjem protoka na kraju dijastole u AU dok protok ne postane odsutan ili obrnut. Tako se Doplerskim mjerenjem protoka u AU procjenjuje otpor protoku krvi u fetoplacentarnoj jedinici. Primjerice, u slučaju ispada do 30% vilozne vaskulature dolazi do povećanja otpora u AU (engl. *AU resistance*) koji dovodi do smanjenog protoka na kraju dijastole (engl. *End-diastolic flow, EDF*) i smatra se slabim prediktorom za nepovoljan ishod trudnoće s IUGR-om, dok u slučaju ispada 60 - 70% vilozne vaskulature, dijastolički protok u AU postaje odsutan ili obrnut te se smatra vrlo nepovoljnim pokazateljem i dobrim prediktorom za prognozu djeteta (99).

Doplerska mjerenja se mogu raditi i u ACM ploda u svrhu praćenja kompenzacijskih mehanizama i centralizacije krvotoka u ploda. Naime, daljnjim napredovanjem cerebrovaskularne hipoksije unatoč centralizaciji krvotoka dolazi do vazodilatacije u području ACM i to se smatra znakom uznapredovale hipoksije i slomom kompenzacijskog mehanizma centralizacije krvotoka. Sa stalnim porastom otpora protoku u AU pogoršava se srčana funkcija, raste centralni venski tlak te rezultira odsutnim ili obrnutim dijastoličkim protokom u venoznom duktusu (lat. *Ductus venosus, DV*) i ostalim velikim venama ploda. Preterminalno se u ploda mogu razviti i trikuspidna regurgitacija te obrnuti protok u silaznom djelu aorte. Promjene u DV-u će se pojaviti oko dva tjedna nakon hemodinamskih promjena u arterijskoj cirkulaciji te ih zato smatramo kasnim promjenama (100,101). Doplerska mjerenja u ACM te napose u DV i umbilikalnoj veni SMFM ne preporučuje u rutinskom praćenju IUGR-a (94).

Ne postoje jasne smjernice vezano za hospitalizaciju trudnica s IUGR-om, jer nema pouzdanih informacija da hospitalizacija i mirovanje poboljšavaju ishod trudnoće kod IUGR-a (69). Ipak, s obzirom na povećane rizike za plod, obično se unutar pojedinih ustanova dogovaraju kriteriji za hospitalizaciju i nadzor, pri čemu je osim procijenjene mase ploda bitan i prirast na tjelesnoj masi tijekom vremena (serijska ultrazvučna mjerenja obično u razmacima



od 2 ili 3 tjedna) te nalazi ostalih, ranije spomenutih pretraga. Trudnicama je pak potrebno dati sve relevantne informacije i objasniti moguće rizike za plod.

### **1.2.7. Način i vrijeme porođaja djeteta s IUGR-om**

Nalazi doplerskih mjerenja u AU i prisustvo još nekog od mogućih znakova uteroplacentarne insuficijencije kao što su oligohidramnij ili preeklampsija, uputit će na učestalost provođenja BPP-a i NST-a te će se sukladno nalazima i ovisno o gestacijskog dobi odlučivati o pravovremenom porođaju procjenjujući rizik od intrauterine nutritivne i respiratorne insuficijencije i posljedično fetalne patnje i moguće smrti, u odnosu na sve rizike prijevremenog porođaja. Naime, kako je već ranije istaknuto, ključno je sustavno pojačano i adekvatno praćenje ploda sa sumnjom u IUGR, jer se tako smanjuje rizik od intrauterine hipoksije i smrti, dok se s druge strane pokušava dosegnuti zrelost ploda s obzirom na povišen morbiditet i mortalitet uzrokovan prijevremenim porođajem, naročito prije 32. tjedna gestacije (64).

Ako se porođaj planira prije 32. navršenog tjedna gestacije, preporučuje se davanje magnezijevog sulfata prije porođaja radi neuroprotekcije, s obzirom da je pokazano da poboljšava kratkoročne i dugoročne ishode prijevremeno rođene djece s IUGR-om (102). Ako očekujemo porođaj do navršena 34 tjedna gestacije preporučuje se antenatalna primjena kortikosteroida za ubrzavanje sazrijevanja fetalnih pluća zbog nadolazećeg porođaja. Između 34. navršenog tjedna pa do 36 tjedana i 6 dana gestacije također je moguća primjena kortikosteroida ako nisu davani ranije i ako očekujemo porođaj unutar 7 dana od primijenjene terapije (63).

Važnost procjene između dobrobiti za plod u nepovoljnim intrauterinim uvjetima koji mogu dovesti do smrti ploda te zdravstvenih posljedica u slučaju prijevremenog porođaja pokazana je studijom GRIT (engl. *Growth restriction intervention trial*). Naime, u grupi u kojoj je odmah uslijedio porođaj pokazana je manja intrauterina smrtnost, no viša neonatalna i infantilna smrtnost, u odnosu na grupu s ekspektativnim pristupom (103). Ipak, pokazano je da je dugoročni neurološki razvoj djece bio sličan u obje grupe (104). Drugom studijom, DIGITAT (engl. *Disproportionate intrauterine growth intervention trial at term*), nije nađena značajna razlika u ishodu bez obzira je li porođaj uslijedio odmah ili nakon ekspektativnog perioda, no

pokazan je neosporno povoljan ishod trudnoće ako je pomno praćeno dijete s IUGR-om porođeno s navršenih 38 tjedana gestacije, s obzirom na dosegnutu znatnu fetalnu zrelost (105).

Prema preporuci ACOG-a, uz uredna doplerska mjerenja u AU kod fetusa mase između 3. i 10. centile, porođaj treba planirati između 38. i 39. tjedna, a ispod 3. centile s navršenih 37 tjedana gestacije (63). Naime, pokazano je da naročito nakon 39. tjedana gestacije raste rizik za intrauterinu smrt ploda, a rizik raste obrnuto proporcionalno masi ploda (106).

S obzirom da su odsutan ili obrnut EDF u AU znakovi fetalnog kardiovaskularnog i metaboličkog pogoršanja te su predisponirajući faktor za nepovoljan fetalni ishod, kako je već ranije naglašeno, kod takvih se plodova intenzivira praćenje te se porođaj prema SMFM-u preporučuje u slučaju odsutnog EDF-a u AU između 33. i 34. tjedna gestacije, a s obrnutim dijastoličkim protokom između 30. i 32. tjedna gestacije. U slučaju perzistentnog reverznog a-vala u DV-u, već se s navršenih 30 tjedana gestacije preporučuje porođaj, dok se prije 30. tjedna preporučuje individualizirani pristup (94), obzirom da je pokazano da se između 26. i 29. tjedna svakim danom trudnoće povećava mogućnost preživljenja ploda za 1 do 2 % (107).

Planiranje optimalnog načina porođaja presudno je kod djece s IUGR-om s obzirom da je zbog učestalije intrauterine asfiksije potreban stalni nadzor ako se planira vaginalni porođaj. Odluka o vaginalnom porođaju donosi se na temelju stanja i kondicije ploda te opstetričkog nalaza trudnice. Naime, fetus s IUGR-om ima smanjenu fetalnu rezervu kisika i hranjivih tvari te zbog toga smanjenu mogućnost kompenziranja dodatnog hipoksijskog stresa uslijed uterinih kontrakcija (trudova), naročito u slučaju insuficijencije posteljice, kada može doći do akutne hipoksije i potrebe za dovršetkom porođaja hitnim carskim rezom.

Uteroplacentarna insuficijencija koja rezultira hipoksijom ploda i metaboličkom acidozom dovodi do povećanog rizika za oštećenje mozga te može doći do razvoja hipoksično-ishemijske encefalopatije, učestalije dolazi do pasaže i aspiracije mekonija, pa je stoga osim intenzivnog nadzora u porođaju ključno imati na raspolaganju neonatologe i mogućnost osiguranja intenzivne neonatalne skrbi (53).

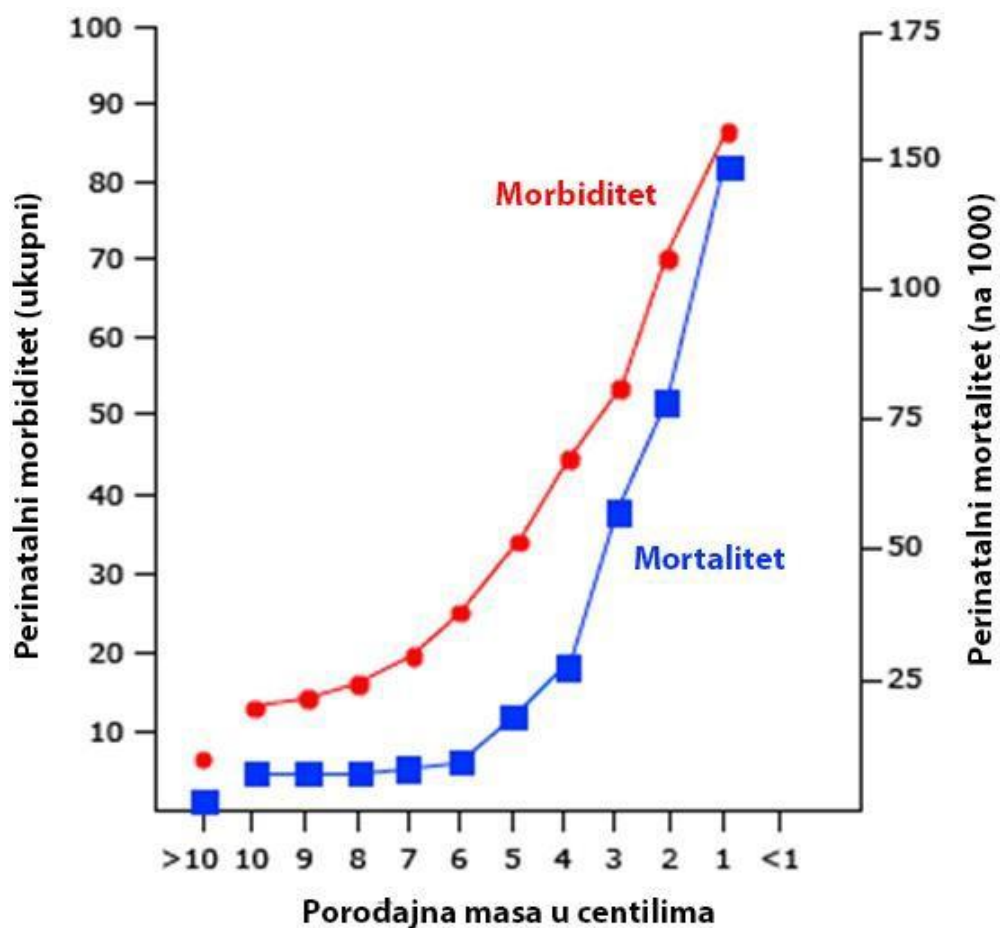
### 1.2.8. Kratkotrajne i dugotrajne posljedice IUGR-a

U djece s IUGR-om povećan je fetalni i neonatalni mortalitet, neonatalni morbiditet i povećana je učestalost abnormalnog neurorazvojnog ishoda (engl. *Neurodevelopmental outcome*) u odnosu na djecu rođenu s urednom tjelesnom masom (108). Mortalitet raste što je manja masa ploda za gestacijsku dob te što je niža gestacijska dob. Pokazano je da fetalni mortalitet naglo raste ispod 6. centile (66), a prema nekim istraživanjima ispod 5. centile, kako u prijevremeno rođene tako i u terminske djece s IUGR-om (109) (Slika 6). Primjerice, kod djece ispod 5. centile za gestacijsku dob mortalitet se penje čak i do 39%, u odnosu na 13% djece s tjelesnom masom između 5. i 10. centile (110). Prema PORTO studiji perinatalni mortalitet još dodatno značajno raste ispod 3. centile, a naročito ako je uz to prisutan i abnormalan protok u AU (111). Upravo zato se tjelesna masa između 3. i 10. centile smatra umjerenim IUGR-om, dok se masa ploda ispod 3. centile klasificira kao teški IUGR. Ponegdje je granica i na 5. centili s obzirom na vrlo značajno povišenje morbiditeta i mortaliteta ispod 5. centile za gestacijsku dob.

U djece s IUGR-om učestaliji je i prijevremeni porođaj - kako spontani prijevremeni porođaj, tako i planirani od strane perinatologa (odnosno jatrogeni), a s njime i svi rizici prijevremenosti. To je vrlo važno s obzirom da je prijevremenost djece i sama najvažniji rizični faktor za neonatalni morbiditet i mortalitet te je kod te djece povećana učestalost nekrotizirajućeg enterokolitisa, akutnog respiratornog distresa (ARDS), bronhopulmonalne displazije i retinopatije (112,113). Zbog intrauterinih kompenzacijskih mehanizama u kroničnoj hipoksiji i smanjenih rezervi glikogena i masnog tkiva kod djece rođene s IUGR-om, u novorođenačko doba ta su djeca sklonija razvoju hipoglikemije, imaju slabiju termoregulaciju te su sklonija hipotermiji, hipokalcemiji i policitemiji te posljedično hiperviskoznosti krvi (114,115). Osim toga, smanjena im je i stanična imunost (116).

Nakon porođaja djece s IUGR-om obično slijedi rano ubrzanje postnatalnog rasta i zabilježena je učestalija pretilost, razvoj metaboličkog sindroma, inzulinske rezistencije i dijabetesa tipa II te koronarne srčane bolesti, hipertenzije i kronične bubrežne bolesti u odrasloj dobi. Prema Barkerovoj hipotezi mnoge kronične bolesti imaju ustvari fetalno podrijetlo jer je intrauterina pothranjenost razlog za promjene u razvoju krvnih žila te je predisponirajući faktor za bolesti poput hipertenzije, infarkta miokarda, dijabetesa i sl. (117). Unatoč tome što se već desetljećima govori o fetalnom programiranju čemu ide u prilog i niz istraživanja, teorija je i

osporavana (118). Osim toga, važno je istaknuti da je tijekom praćenja kasnijeg razvoja, u adolescenciji, nađeno da djeca rođena s IUGR-om imaju lošije rezultate testova kognitivnih sposobnosti (engl. *Cognitive performance scores*) u odnosu na vršnjake rođene iz urednih trudnoća (119,120).



**Slika 6.** Odnos perinatalnog morbiditeta i mortaliteta u odnosu na porođajnu masu izraženu u centilima. Preuređeno i preuzeto iz (66).

### 1.3. SIGNALNI PUT WINGLESS

Postoji tek nekoliko evolucijski očuvanih puteva, konzerviranih od najjednostavnijih organizama do čovjeka koji su presudni za razvoj ključnih procesa u različitim stanicama. Osim signalnog puta Hh (engl. *Hedgehog*) i Wnt (engl. *Wingless*) o kojima ćemo ovdje govoriti detaljnije, u tu grupu spadaju i putevi posredovani receptorom tirozin kinaze (engl. *Receptor tyrosine kinase-mediated pathway*), Notch, Tgf  $\beta$ /BMP (engl. *Transforming growth factor  $\beta$ /Bone morphologic protein, BMP*) i Hippo (121). Bitno je naglasiti da je u procesima implantacije i placentacije uloga signalnog puta Hh dosta slabije istražena u odnosu na ulogu signalnog puta Wnt.

Signalni put Wnt je evolucijski očuvan put od vinske mušice (lat. *Drosophila melanogaster*) do čovjeka. Naime, Wnt1 proto-onkogen je bio prvi opisani Wnt ligand za kojega je nađeno da je evolucijski očuvan jer odgovara genu *Wingless* u *Drosophile*. Taj je gen prvi puta opisao Nusse i sur. (122) na 15. kromosomu u miša kao gen koji može dovesti do razvoja tumora te je prvotno bio imenovan *Int-1*, a kasnije je kombinacijom riječi *Wingless* i *Int-1* skovana složenica Wnt kao ime novoga signalnog puta (123).

Signalni put Wnt je ključan za diferencijaciju, migraciju, proliferaciju, invaziju, polarnost stanica, apoptozu te organogenezu tijekom embrionalnoga razvoja (3,124). U odraslom organizmu regulirajući obnovu i održavanje matičnih stanica te diferencijaciju i sudbinu stanice (engl. *Cell fate*) kontrolira homeostazu i regeneraciju tkiva (125). Ipak, u odnosu na njegovu vrlo izraženu aktivnost tijekom embrionalnog razvoja, neaktivan je u mnogim stanicama odraslog organizma. Njegova je reaktivacija u odraslom organizmu povezana s neoplastičnom pretvorbom stanica te sudjelovanjem u nastanku i progresiji različitih malignih bolesti (126–129). Poremećena ekspresija aktera signalnog puta Wnt povezana je s razvojem preeklampsije i IUGR-a, razvojnih poremećaja različitih organa te neuropsihijatrijskih poremećaja (130–132).

Unatoč tome što o ulozi signalnog puta Wnt u placentaciji i razvoju zametka imamo više saznanja nego o signalnom putu Hh, još uvijek ostaje niz nepoznanica vezano za ovaj put i sve njegove podvrste, brojne sudionike te višestruke moguće interakcije među njima kao i između različitih signalnih puteva. To je bitno stoga što se poznavanjem svega navedenoga te uzimajući u obzir važnost signalnog puta Wnt otvara mogućnost razvoja preventivnih strategija, markera za ranu detekciju, napredovanje bolesti, razvoja novih lijekova i terapijskih postupaka.

### 1.3.1. Ključni sudionici signalnog puta Wnt

#### 1.3.1.1. Wnt ligandi i WNT5A

Wnt ligandi su obitelj od 19 različitih signalnih cisteinom bogatih sekretornih glikoproteina. (133). Vezivanjem točno određenih Wnt liganda za točno određene membranske Frizzled receptore (Fz) pokreće se kaskada signalizacije koja će dovesti do transkripcije ciljnih gena u jezgri. Pojedini Wnt ligandi specifično mogu pokretati samo kanonski ili samo nekanonski put Wnt, odnosno tek jedan od nekanonskih puteva. WNT5A ligand može pokrenuti oba signalna puta Wnt te oba nekanonska puta. S obzirom da djeluje na obje podvrste nekanonskoga puta, smatra se predstavnikom nekanonskog signalnog Wnt proteina u kojem preko ROR2 receptora (engl. *Receptor tyrosin kinase like orphan receptor 2*) potiče migraciju stanica (13).

Dapače, nađeno je da je upravo njegova uloga u nekanonskom putu Wnt ključna za konvergentnu ekstenziju (engl. *Convergent extension*, CE) te uspostavu anteriorno-posteriorne osi zametka (engl. *Anterio-posterior axis*) ključne za definiranje tjelesnog plana (engl. *Body plan*) embrija tijekom razvoja kralježnjaka (134). Međutim, WNT5A istovremeno u specifičnim uvjetima može imati i ulogu antagonista signalnog puta Wnt te se smatra tumor- supresorom u mnogim karcinomima (3).

Naime, pokazano je da WNT5A pokrećući signalizaciju na nekanonskom putu Wnt može djelovati kao antagonist kanonskog puta Wnt o čemu će još biti govora u nastavku (11). Upravo na primjeru WNT5A postaje nam jasnija kompleksnost signalnih puteva Wnt, njihovih međusobnih interakcija i višestruke uloga WNT5A u tim procesima (135).

#### 1.3.1.2. Frizzled receptori

Skupinu Frizzled receptora čini grupa od 10 različitih transmembranskih receptora sa sedam transmembranskih domena te aminoterminalnom domenom koja je bogata cisteinom i za koju se veže Wnt ligand (136). U kanonskom putu zajedno s koreceptorima LRP-5 i LRP-6 (engl. *Low-density-lipoprotein-related protein 5/6*) formiraju funkcionalnu cjelinu, odnosno receptor za kanonski put.

### 1.3.1.3. $\beta$ -katenin

$\beta$ -katenin je evolucijski očuvani transkripcijski kofaktor kodiran genom *CTNNB1* (engl. *Catenin beta 1*) na 3. kromosomu koji predstavlja jednu od ključnih molekula u kaskadi kanonskog, odnosno o  $\beta$ -kateninu ovisnog signalnog puta Wnt. Naime, translokacijom  $\beta$ -katenina iz citoplazme u jezgru aktiviraju se transkripcijski faktori TCF/LEF (engl. *T-cell factor/lymphoid-enhanced binding factor*) koji potiču transkripciju gena uključenih u diferencijaciju, migraciju, proliferaciju, invaziju i apoptozu stanica (137). Pokazano je da je u sisavaca  $\beta$ -katenin odsudan za formiranje anteriorno-posteriorne osi zametka, kao i za formiranje mezoderma (138). Osim toga, pokazano je da ima važnu ulogu u procesu EMT koja je ključna kako tijekom embrionalnog razvoja, tako i kod ostvarivanja invazivnog potencijala malignih stanica i nastanka metastaza (10).  $\beta$ -katenin je u stanici vezan u degradacijski kompleks kojeg sačinjavaju APC (engl. *Adenomatous polyposis coli*)/Axin/CK1 $\alpha$  (engl. *Casein kinase 1 $\alpha$* )/GSK3 $\beta$  (engl. *Glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ). Defosforilacija komponenti destruktivnog kompleksa dovodi do otpuštanja  $\beta$ -katenina te njegove translokacije u jezgru. Sam mehanizam ulaska  $\beta$ -katenina u jezgru nije do sada sasvim razjašnjen (10).

### 1.3.1.4. Destrukcijski kompleks

Kako je već ranije navedeno, destruktivski kompleks se sastoji od APC/Axin/CK1 $\alpha$ / GSK3 $\beta$  te se smatra ključnim za stabilizaciju  $\beta$ -katenina. Osnovna zadaća spomenutog kompleksa je fosforilacija i time razgradnja  $\beta$ -katenina. CK1 $\alpha$  se smatra početnom kinazom u fosforilaciji  $\beta$ -katenina, a nakon nje slijedi fosforilacija putem GSK3 $\beta$  (139,140). *APC* je poznati tumor supresor gen čiji proteinski produkt potiče razgradnju  $\beta$ -katenina na način koji još nije poznat, no smatra se da bi mogao biti posredovan Axinom (141). Njegova je disfunkcija povezana s nastankom kolorektalnog karcinoma, pa je tako nađeno da u slučaju delecije gena *APC* u kolorektalnom karcinomu dolazi do stabilizacije i nakupljanja  $\beta$ -katenina te posljedično aktivacije kanonskog puta Wnt te nastanka i progresije bolesti (142).

### 1.3.1.5. *Dishevelled* (DVL)

*Dishevelled*, Dsh, odnosno DVL u čovjeka, je regulatorni i modularni citoplazmatski protein koji je ključan i za kanonsku i za nekanonsku signalizaciju (143). Svi DVL proteini od mušice do čovjeka sadrže tri različite evolucijski očuvane domene - DIX, DPZ i DEP (144). Određene domene odgovaraju određenom ogranku puta, pa je tako amino DIX domena specifična za kanonski put jer veže Axin iz destrukcijskog kompleksa, dok je DEP specifična za nekanonske puteve, a DPZ domena je aktivna u svim signalnim putevima Wnt (143).

### 1.3.1.6. TCF/LEF

TCF/LEF je obitelj transkripcijskih faktora koja se u kralježnjaka sastoji od TCF1 - TCF4 i LEF1 te se smatra da svaki od njih pojedinačno može komunicirati s  $\beta$ -kateninom koji djeluje kao njihov transkripcijski kofaktor, s obzirom na to da samostalno ne mogu pokrenuti transkripciju gena. Dapače, u odsustvu  $\beta$ -katenina TCF transkripcijski faktori djeluju kao transkripcijski represori te ih samo vezivanje  $\beta$ -katenina pretvara u transkripcijske aktivatore (145). Postoji niz Wnt/TCF/ $\beta$ -katenin ciljnih gena, a njihova ekspresija je tkivno specifična i vremenski ograničena (146).

## 1.3.2. Vrste signalnih puteva Wnt

Signalni put Wnt se dijeli na kanonski put koji je ovisan o  $\beta$ -kateninu te nekanonski put koji je neovisan o  $\beta$ -kateninu i koji se dalje dijeli na signalni put Wnt/PCP (engl. *Planar Cell Polarity*) i Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ . Radi se o vrlo kompleksnom signalnom putu koji je rezultat interakcije niza signala, agonista i antagonista koji ga vremenski i prostorno vrlo precizno reguliraju (147). O samoj kompleksnosti i višestrukim učincima signalnog puta Wnt slikovito govori podatak da postoji čak 19 različitih Wnt liganda koji vezanjem na desetak transmembranskih Fz receptora mogu stvoriti i 190 različitih kombinacija koje imaju raznovrsne učinke na stanicu (148). Kada se tome doda činjenica da sami Fz receptori često trebaju koreceptore koji mogu smanjiti ili pojačati njihov učinak, a kojih također ima više te da se spajanjem Wnt liganda na Fz receptor



s koreceptorom može aktivirati u stanici više različitih ogranaka signalnog puta Wnt, dobiva se još bolji uvid u svu kompleksnost ovog puta.

Osim toga, postoji i niz različitih antagonista signalnog puta Wnt koji su ključni za njegovu regulaciju kao što su Dkk (Dickkopf-1), SFRP (engl. *Soluble Fizzled-related protein*), WIF (engl. *Wnt-inhibitor protein*), IWP-2 (engl. *Inhibitor of Wnt production 2*) (149–152).

Do danas nije potpuno jasno postoje li točno određeni, specifični Wnt ligandi i Fz receptori za pojedine ogranke Wnt puta, jer isti Wnt ligandi mogu aktivirati i kanonski i nekanonski put (149). Ipak, čini se da bi koreceptori na Fz receptoru mogli određivati ogranak signalnog puta, pa su tako LRP 5 i 6 prisutni u kanonskom, dok su NRH1 (engl. *Neutrophin Receptor Homolog 1*), PTK7 (engl. *Protein Tyrosine kinase 7*) i ROR2 prisutni u nekanonskom putu. Kombinacije pojedinih Wnt liganda i Fz receptora u pojedinim tipovima stanica bi također mogle biti važne u odabiru ogranka puta (143).

### **1.3.2.1. Kanonski put Wnt**

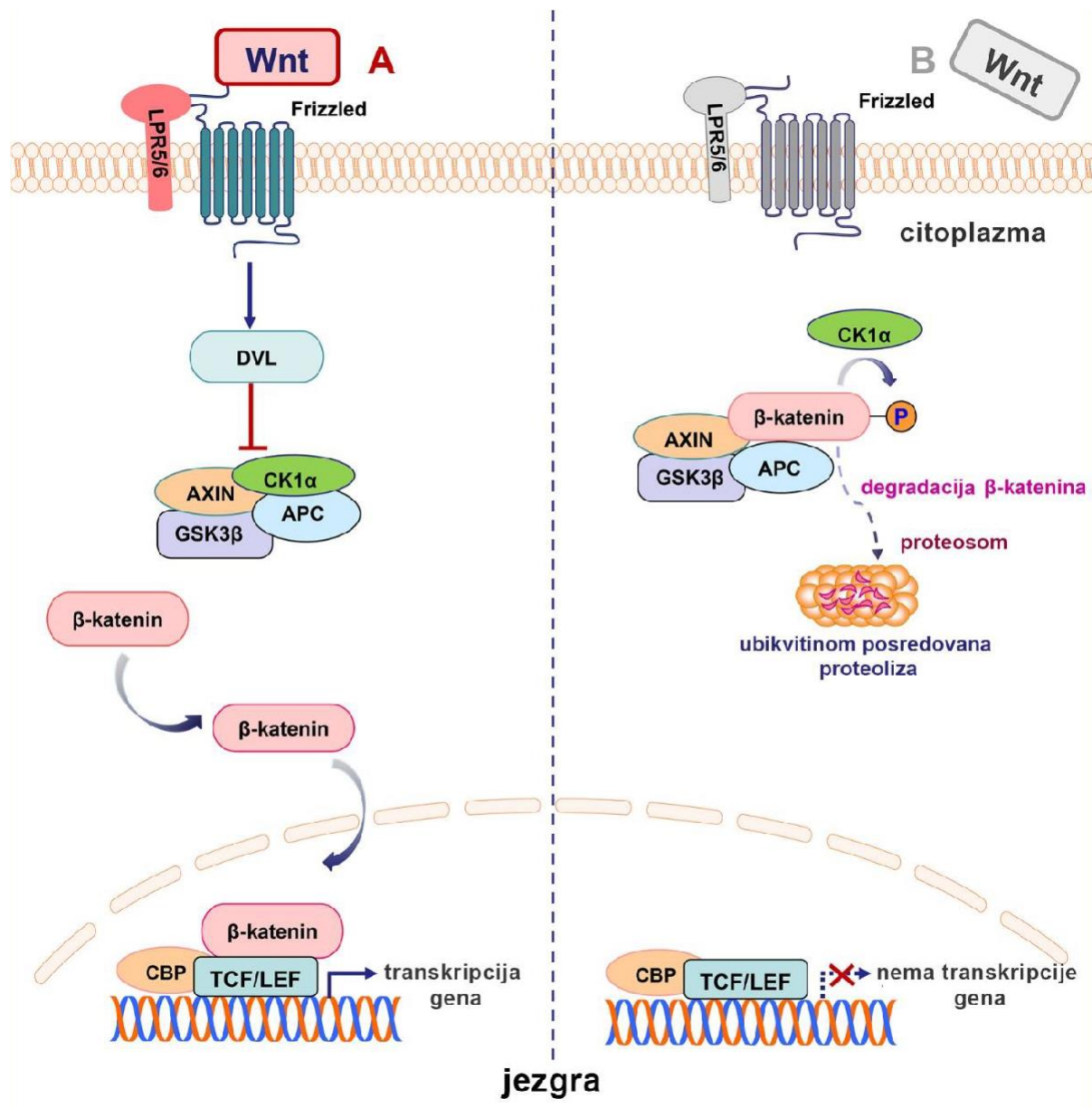
Najviše istražen od signalnih puteva Wnt je kanonski ili Wnt/ $\beta$ -katenin ovisni put. Kanonski put Wnt je neophodan za diferencijaciju, proliferaciju, migraciju i invaziju stanica te za tkivnu homeostazu (153,154), stoga ne čudi povezanost njegove abnormalne regulacije s razvojem brojnih malignih bolesti (155,156). Potiče rezistenciju na kemoterapeutike (157) čime se pogoršava preživljenje u oboljelih od karcinoma, no ujedno i pruža mogućnost razvoja novih antitumorskih lijekova (143,144).

U kanonskom putu Wnt ključnu ulogu u prijenosu signala u jezgru stanice ima citoplazmatski protein  $\beta$ -katenin koji je reguliran destruktivskim kompleksom. Kada Wnt ligandi nisu vezani na receptor Fz/LRP, destruktivski kompleks APC/Axin/CK1 $\alpha$ /GSK3 $\beta$  inaktivira  $\beta$ -katenin. Unutar destruktivskog kompleksa dva potonja spoja fosforiliraju  $\beta$ -katenin te dolazi do njegove inaktivacije i proteolitičke razgradnje (158).

No, ako dođe do vezanja jednog od izvanstaničnih Wnt liganda među kojima je i WNT5A, za jedan od transmembranskih Fz receptora, dolazi do aktivacije unutarstaničnog proteina DVL u citoplazmi. DVL razgrađuje destruktivski kompleks i omogućava slobodno nakupljanje  $\beta$ -

katena u citoplazmi u aktivnom i stabilnom, nefosforiliranom obliku te on potom ulazi u jezgru gdje služi kao transkripcijski koaktivator (159).

U jezgri se  $\beta$ -katenin veže za TCF/LEF obitelj transkripcijskih faktora, čime je omogućena transkripcija ciljnih gena koji kontroliraju niz razvojnih procesa, poput diferencijacije i invazije stanica (125) (Slika 7).



**Slika 7.** Vezivanjem Wnt liganda za *Frizzled* receptor i LRP5/6 koreceptor (A), dolazi do aktivacije citoplazmatskog proteina DVL koji razgrađuje destruktivni kompleks što oslobađa

i stabilizira  $\beta$ -katenin pa slijedi njegova translokacija iz citoplazme u jezgru. Nuklearni  $\beta$ -katenin udružen s transkripcijskim faktorima TCF/LEF potiče transkripciju ciljnih gena. Kada izostane vezanje Wnt liganda na Fz receptor (B), dolazi do fosforilacije i time inaktivacije  $\beta$ -katenina putem ubikvitin-proteosomalne degradacije te izostanka njegova prijenosa u jezgru i prepisivanja ciljnih gena. CBP (engl. *CREB binding protein*) u kralježnjaka djeluje kao transkripcijski koaktivator koji se veže za TCF (160). Preuzeto i prilagođeno iz (161).

### 1.3.2.2. Nekanonski put Wnt i uloga proteina WNT5A

Nekanonski put Wnt je neovisan o  $\beta$ -kateninu, no za urednu signalizaciju mu je, baš kao i kanonskom putu, potreban Fz receptor te DVL protein na razini kojega se dalje grana na Wnt/PCP i Wnt/Ca<sup>2+</sup> ogranak, kako je već ranije navedeno. Ipak, potrebno je istaknuti da do sada još nije razjašnjeno koliko ogranaka nekanonskog puta zasigurno postoji i koliko se međusobno preklapaju, pa tako različiti autori sugeriraju više mogućih krakova puta s određenim komponentama koje djeluju vremenski i tkivno specifično (162). Osim toga, kako je već ranije naglašeno, WNT5A je izvanstanični Wnt ligand koji može pokrenuti signalizaciju kako u kanonskom, tako i u oba ogranka nekanonskog puta (135).

U nekanonskom putu Wnt/PCP signalizaciju pokreću ligandi WNT4, WNT5A i WNT11 vezivanjem za Fz receptor s tim da nije potrebna prisutnost LRP5/6 koreceptora (124,158) ali se mogu aktivirati drugi koreceptori poput ROR2, i Ryk (13,163). Za signalizaciju je potom nužna DEP domena DVL proteina nakon čega put više nije linearan te uključuje niz različitih proteina kao što su ROCK (engl. *Rho-associated protein kinase*), Prickle, Strabismus, Flamingo i drugi (143,162,164). Wnt/PCP krak signalnog puta Wnt važan je u embriogenezi, dok je u odraslom organizmu povezan sa razvojem karcinoma i širenjem metastaza (165).

Drugi ogranak nekanonskog puta, put Wnt/Ca<sup>2+</sup>, dijeli mnoge značajke i komponente sa signalnim putem Wnt/PCP te ga također pokreću WNT5A i WNT11 (166). Vezivanje WNT5A i WNT11 liganda na Fz2 receptor oslobađa se unutarstanični Ca<sup>2+</sup> te aktivira proteine osjetljive na kalcij kao što su protein kinaza C (engl. *Protein kinase C*, PKC) i CamKII (engl. *Calcium/calmodulin-dependant kinase II*) te pokreće signalizaciju. Pokazano je da osim puta Wnt/Ca<sup>2+</sup>, i put Wnt/PCP također može dovesti do oslobađanja unutarstaničnog kalcija, što čini dodatnu poveznicu i preklapanje između ovih nekanonskih puteva Wnt (162).

Nekanonski putevi Wnt su vrlo značajni i stoga što mogu inhibirati kanonski put Wnt, kako je već ranije napomenuto. Tako je pokazano da WNT5A na nekanonskom putu može aktivirati NLK (engl. *Nemo-like kinase*) čime se kroz fosforilaciju TCF/LEF transkripcijskih faktora inhibira kanonski put Wnt, ili pak pojačati transkripciju SIAH2 čime se potiče degradacija  $\beta$ -katenina što čini WNT5A i antagonistom kanonskog puta Wnt (11,167,168).

### 1.3.3. Wnt signalizacija u posteljici i uloga WNT5A i $\beta$ -katenina

14 od 19 Wnt liganda, među kojima je i WNT5A, i 8 od 10 Fz receptora prisutno je u ljudskoj posteljici u prvom tromjesečju, što ukazuje na značajnu i složenu aktivnost signalnog puta Wnt u vrijeme rane trudnoće (3). Ekspresija niza Wnt liganda iz kanonskog i nekanonskih puteva na stanicama CTB-a regulira proliferaciju te diferencijaciju u invazivni EVT. U studijama na mišjem modelu nađeno je da bi nekanonski put Wnt/ $Ca^{2+}$  mogao biti uključen u razvoj same blastociste (169). Čini da kanonski put nema veće uloge u razvoju same blastociste, no ključan je za njezinu aktivaciju, adheziju za endometriju te implantaciju, kako je pokazano na eksperimentalnom modelu miša, a kasnije i na staničnim linijama trofoblata iz humanih posteljica (3,170).

Smatra se da je signalni put Wnt ključan za regulaciju interakcije između zametka i endometrija (171). Naime, uočeno je da invazivni trofoblast u humanim posteljicama u svojim jezgrama ima povećanu ekspresiju  $\beta$ -katenina u hidatiformne mole, u odnosu na zdravu posteljicu. To znači da, iako je signalni put Wnt neophodan za normalnu placentaciju, njegova prejak aktivacija može dovesti do pojačane invazivnosti te je pokazano da može dovesti i do razvoja koriokarcinoma (172). Suprotno tome, u slučaju smanjene ekspresije (engl. *Downregulation*) puta Wnt dolazi do plitke invazije trofoblata i posljedično plitke placentacije. Tako je nađena značajno smanjena ekspresija proteina WNT2 i  $\beta$ -katenina u posteljicama kod preeklampsije, dok je istovremeno uočena pojačana ekspresija inhibitora puta Wnt - proteina DKK1 i SFRP4 (173). Osim toga, povećana razina DKK1 uočena je u posteljicama žena s habitualnim pobačajima (174).

Smanjena ekspresija proteina WNT5A dovodi do smanjene invazije stanica trofoblata što posljedično može dovesti do preeklampsije (169,175). Važnost WNT5A je vidljiva u činjenici

da gubitak ekspresije WNT5A u mišjem uterusu sprječava implantaciju, decidualizaciju i razvoj posteljice što upućuje na presudnu ulogu regulacije WNT5A za uspješnu trudnoću (12).

Kanonski put Wnt ima ključnu ulogu u diferencijaciji EVT-a te u poticanju ekspresije promigratornih gena u EVT-u (176). Smatra se da je ključan i za uredno odvijanje fizioloških procesa u humanom trofoblastu, kontroli proliferacije i invazije stanica trofoblasta te da je odsudan za fuziju trofoblasta i razvoj usidrenih resica (4,177). Nadalje, u kulturama humanih trofoblastnih stanica pokazano je da stimulacija Wnt ligandima povećava invazivost i migraciju različitih stanica trofoblasta te da dolazi do aktivacije i kanonskog i nekanonskih signalnih puteva Wnt (126,172).

Hiperaktivacija kanonskog puta Wnt uzrokuje poremećenu diferencijaciju trofoblasta u ektoplacentalnom stošcu (engl. *Ecto placental cone*, EPC) i zaustavlja diferencijaciju trofoblasta u mišjoj posteljici (178). Wnt7b kontrolira fuziju koriona i alantoisa u miša, grananje korionskih resica i fuzije stranica trofoblasta te posteljичno stvaranje i grananje krvnih žila (4,179,180). Nadalje, kod miševa nokautiranih za *Wnt2* perinatalni mortalitet je 50% zbog smanjenog stvaranja kapilara u posteljici (181).

Osim u implantaciji i placentaciji, signalni put Wnt vrlo je važan i za razvoj same maternice, obzirom na važnu ulogu koju ima u diferencijaciji stanica u maternici. Uz WNT4 i WNT7A upravo WNT5A ima ključnu ulogu u razvoju maternice (182,183).

#### **1.4. SIGNALNI PUT HEDGEHOG**

Signalni put Hedgehog (Hh) je otkriven 1980. godine na larvi vinske mušice gdje je mutacija u genu *Hh* prouzročila poremećaj razvoja tjelesnog plana (engl. *Body plan*) te je larva izgledala izobličeno sa šiljastim promjenama koje su podsjećale na ježeve bodlje pa su tako gen i signalni put koji kodira dobili ime po ježu (engl. *Hedgehog*) (184). *Hh* geni su potom izolirani iz stanica niza drugih životinjskih vrsta, a 1995. godine su pronađeni i izolirani u čovjeka (185). Utvrđeno je da je signalni put Hh jedan od evolucijski očuvanih signalnih puteva, no postoje važne razlike i specifičnosti u signalizaciji između kralježnjaka i beskralježnjaka te je u kralježnjaka bitno kompleksniji (186). Razlog tom povećavanju složenosti signalnog puta Hh od mušice prema

čovjeku mogao bi biti posljedica evolucijske prilagodbe puta prema sve kompleksnijim stanicama i sve složenijim organizmima (20).

Signalni put Hh je ključan za regulaciju proliferacije, diferencijacije, migracije, preživljenja i polarnosti stanica tijekom embrionalnog razvoja. Neophodan je za razvoj gotovo svih organskih sustava (186). Naime, izostanak signalizacije Hh tijekom embriogeneze dovodi do niza vrlo teških razvojnih poremećaja kao što je holoprozencefalija, kraniofacijalni defekti, malformacije skeleta, polidaktilija i dr. (187).

U odraslom organizmu je signalni put Hh u mnogim tkivima neaktivan. Ipak, u pojedinim tkivima odraslog čovjeka ostaje aktivan te se smatra da kontrolira koštanu homeostazu tako što njegova aktivacija potiče resorpciju kosti (188). Smatra se da bi mogao imati i vrlo važnu ulogu u muškoj gonadi zbog regulacije Sertolijevih stanica te isto tako zbog regulacije teka stanica u ženskoj gonadi (189,190). Osim toga, uključen je u održavanje somatskih matičnih stanica te pluripotentnih stanica različitih tkiva. Primjerice, vrlo je važan u regeneraciji epitela pluća, prostate i egzokrinih stanica gušterače te napose u procesu cijeljenju različitih tkiva (191). Signalni put Hh izravno regulira proliferaciju i rast stanica te njihovo preživljenje što također upućuje na njegovu važnost u održavanju homeostaze odraslog organizma (20).

Stoga ni ne čudi činjenica da je pokazano kako aberantna aktivacija signalnog puta Hh tijekom života dovodi do razvoja i progresije različitih zloćudnih bolesti te je upravo to područje u kojem je najviše istraživano. Naime, smatra se da je aberantna aktivacija signalnog puta Hh uključena u rane stadije karcinogeneze, te da u kasnijim fazama razvoja tumora pridonosi njegovom invazivnom i metastatskom potencijalu (192). Tako se upravo njegova aberantna aktivacija veže za gotovo sve slučajeve bazocelularnog karcinoma, a uključen je i u patogenezu meduloblastoma, rabdomiosarkoma, glioma, karcinoma dojke, jednjaka, jajnika, želuca, gušterače, prostate, jetre, mokraćnog mjehura, mikrocelularnog karcinoma pluća i karcinoma usne šupljine (20,184,191). Ova činjenica otvara goleme mogućnosti u razvoju učinkovitih ciljanih terapija, pogotovo s obzirom na to da se u odrasloj dobi blokada signalnog puta Hh dobro podnosi (193). Primjerice, pokazano je da specifično monoklonalno protutijelo na protein SHH (engl. *Sonic Hedgehog*) može blokirati rast mikrocelularnog karcinoma pluća (194).

Ipak, još postoje mnoge nepoznanice vezane uz signalni put Hh. Otkrivamo njegove moguće agoniste i antagoniste, ne znamo još u potpunosti koje sve gene zapravo može regulirati te će

zato biti potrebna brojna istraživanja kako bismo ga do kraja upoznali i dobili mogućnost razvoja novih lijekova (184). Ono što čini još dodatni izazov za razvoj novih lijekova i postupaka koji bi ciljano djelovali na pojedine komponente i procese u signalnom putu Hh, jest činjenica višestrukih interakcija između različitih signalnih puteva (engl. *Cross-talk*) koje mogu biti tkivno specifične te ovisiti o nizu još neotkrivenih faktora te koje mogu posredno utjecati na različite procese u stanici, o čemu će još biti govora u daljnjem tekstu.

## 1.4.1. Ključni sudionici signalnog puta Hh

### 1.4.1.1. Hh ligandi

Hh ligandi su evolucijski konzervirani od mušice do čovjeka, s tim da u mušice postoji jedan, dok u kralježnjaka, pa tako i u čovjeka, postoje tri različita Hh liganda – IHH (engl. *Indian Hedgehog*), SHH (engl. *Sonic Hedgehog*) i DHH (engl. *Desert Hedgehog*). Oni djeluju kao mitogeni jer potiču i povećavaju brzinu diobe stanice. Osim toga, djeluju i kao faktori diferencijacije i morfogeni u različitim tkivima i u različitim fazama razvoja tkiva (186). Velika raznolikost tkiva i razvojnih procesa u kojima sudjeluju Hh ligandi moguća je stoga što stanice različitih tkiva različito odgovaraju na Hh signal, što signalni put Hh čini tkivno specifičnim. Odgovor ciljnih tkiva uvelike ovisi o intenzitetu signalizacije, odnosno o količini Hh liganda koji započinje signal te o preciznom vremenu u kojem je aktivan. Važnost toga najbolje je vidljiva tijekom razvoja neuralne cijevi gdje su količina SHH liganda te njezin različit koncentracijski gradijent duž ventralnog djela neuralne cijevi u točno određeno vrijeme odgovorni za precizno pozicioniranje i diferenciranje u pojedine specifične podtipove neuralnih stanica (195).

Signalizacija započinje s jednim od spomenuta tri Hh liganda čija se ekspresija znatno razlikuje među različitim tkivima, kako je ranije već napomenuto, a bitno je istaknuti da u nekim tkivima djeluju zajedno, nadopunjujući i upotpunjujući međusobno djelovanje. Primjerice, DHH i IHH su eksprimirani u granulosa stanicama primarnog folikula te potiču ekspresiju ciljnih gena na teka stanicama čime sudjeluju u rastu teka stanica i u steroidogenezi te sazrijevanju jajne stanice do ovulacije (190). DHH je eksprimiran i u muškim gonadama te je ključan za njihov uredan razvoj i funkciju. Naime, pokazano je da bi upravo DHH

signalizacija moglo imati ključnu ulogu u regulaciji spermatogeneze u sisavaca (189). Osim toga, IHH regulira proliferaciju i diferencijaciju hondrocita u koštanom pločama rasta te ih usklađuje s koštanom angiogenezom, čime se omogućava rast kostiju. Tijekom ranog razvoja zametka IHH je ključan za razvoj krvnih žila u žumanjčanoj vreći (196). Nadalje, IHH je uz SHH neophodan za razvoj probavne cijevi te komunikaciju između endodermalnih i mezodermalnih stanica u probavnoj cijevi. Nađeno je da mutacije ovih liganda te drugih sudionika signalnog puta Hh dovode do atrezije ezofagusa, duodenuma ili anusa te traheozofagealnih fistula, malrotacije crijeva i nastanka prstenastog pankreasa (197). SHH može snažno potaknuti i angiogenezu te se smatra indirektnim angiogenim faktorom koji regulira ekspresiju niza angiogenih citokina (198). SHH je najrasprostranjenija signalna molekula u signalnom putu Hh te je važan za razvoj mnogih tkiva kao što su mozak, kralježnična moždina, distalni dijelovi udova, bubreg, pluća i dr. (184,199). SHH također regulira EMT tijekom embrionalnog razvoja, o čemu će više biti govora u daljnjem tekstu. Zajednička ekspresija IHH i SHH je također neophodna za ekstraembrionalnu vaskulogenezu i razvoj srca, a u slučaju izostanka signalizacije dolazi do smrti zametka (200).

#### 1.4.1.2. PTCH

Transmembranski receptor PTCH (engl. *Protein patched homolog; Patched*) smatra se vrlo važnim receptorom u embrionalnom razvoju kralježnjaka. Za razliku od većine receptora, aktivnost PTCH zaustavlja signalizaciju Hh u odsutnosti Hh liganda koji se veže na PTCH. Vezanje Hh liganda za PTCH oslobađa susjedni transmembranski protein SMO (engl. *Smoothened*) koji je glavni pozitivni medijator signalnog puta Hh s obzirom da regulira proteine GLI 1-3 (engl. *Glioma-associated oncogene 1-3*). Dakle, aktivni SMO regulira transkripcijski faktor Ci (*Cubitus interruptus*) u *Drosophila* odnosno GLI u kralježnjaka tako da GLI-FL (engl. *GLI-Full length*) postane transkripcijski aktivator, dok u odsutnosti Hh liganda dolazi do proteolitičke razgradnje GLI u kraću formu, GLI-R (engl. *GLI-Repressor*), koja potom djeluje kao transkripcijski represor ciljnih gena. Nuklearna translokacija, baš kao i proteolitička razgradnja GLI pomno su regulirani putem proteinskog kompleksa koji sadrži Kif 7 (engl. *Kinesin protein 7*) te protein SUFU (engl. *Suppressor of Fused*).



PTCH se u kralježnjaka pojavljuje u dvije izoforme - PTCH1 i PTCH2 (186). Sva tri Hh liganda imaju približno jednak afinitet vezanja za oba receptora, te oba receptora čine potom kompleks sa SMO. PTCH1 je eksprimiran u različitim embrionalnim stanicama, za njega se primarno veže SHH i poznamo njegov represivni učinak na SMO. Kad je pak riječ o PTCH2, naša su saznanja bitno skromnija. Naime, povišena ekspresija PTCH2 nađena je samo u stanicama kože i testisa, odnosno spermatoocita te se vjeruje da bi mogao suprimirati signalni put Hh i neovisno o SMO-u, no njegova stvarna uloga za sada još nije sa sigurnošću utvrđena (201,202).

Važnost signalizacije Hh te uloga PTCH-a u signalnom putu Hh jasno je vidljiva na primjeru Gorlinovog sindroma (engl. *Nevoid basal cell carcinoma syndrom*, NBCCS), autosomno dominantnog sindroma koji je posljedica mutacije jedne kopije alela *PTCH1*. Bolest se očituje nastankom multiplih nevoidnih bazocelularnih karcinoma kože lica, vrata i trupa, odontogenim cistama čeljusti, intrakranijalnim kalcifikacijama i koštanim anomalijama, najčešće prstiju, rebara i kralježaka (203).

### **1.4.1.3. SMO**

SMO je integralni membranski protein koji čini jednu od komponenti receptorskog kompleksa u signalnom putu Hh što ga ustvari čini koreceptorom (191). Sadrži sedam transmembranskih domena te podsjeća na Fz receptor u signalnom putu Wnt. Naime, oba receptora sadrže N-terminalnu ekstracelularnu domenu bogatu cisteinom (engl. *Cistein-rich domain*, CRD) koja u Fz receptora omogućuje vezivanje Wnt liganda. Hh ligandi indirektno, preko PTCH receptora, reguliraju aktivnost SMO-a koja je, kako je već ranije napomenuto, tkivno specifična, ovisna o koncentraciji Hh liganda te koja potom ovisno o poticanju specifičnog GLI-a aktivira ili suprimira daljnju Hh signalizaciju. Ipak, sam način na koji PTCH regulira SMO u bilo kojoj životinjskoj vrsti nije do kraja poznat, te je pitanje postoji li direktna komunikacija ili se ona odvija posredno preko drugih specifičnih molekula (121).

### **1.4.1.4. KIF7**

KIF7 može djelovati i kao pozitivni i kao negativni regulator signalnog puta Hh no još uvijek nije sasvim poznat mehanizam kojim to ostvaruje (191). Ipak, poznato je da mu je temeljna

zadaca kontrola i organizacija strukture primarne cilije (PC) koja je neophodna za Hh signalizaciju, o čemu će još biti govora u daljnjem tekstu. Naime, kada signalni put Hh nije aktivan, KIF7 je fosforiliran te se nakuplja u bazi (podnožju) PC, dok prilikom aktivacije Hh signalizacije dolazi do njegove defosforilacije i nakupljanja na vrhu PC gdje kontrolira organizaciju cilijarnih mikrotubula (204).

#### 1.4.1.5. GLI

Uloga proteina SMO je aktivacija transkripcijskih regulatora GLI. Radi se o obitelji proteina s motivom cinkovog prsta (engl. *Zinc finger proteins*) koji su prvi puta izolirani iz tkiva glioblastoma, po čemu su i dobili ime (205). U kralježnjaka postoje tri homologna GLI proteina (GLI 1-3) koji imaju različite uloge u Hh signalizaciji. GLI1 ima funkciju transkripcijskog aktivatora i neophodan je za uredan embrionalni razvoj, omogućava pozitivnu povratnu spregu za Hh signalizaciju i produljen odgovor stanica na Hh signal. GLI2 također djeluje kao transkripcijski aktivator (206). GLI3 primarno djeluje kao represor signalnog puta Hh. GLI2 i GLI3 su najjače regulirani svojim posttranslacijskim modifikacijama (omjerom svojih aktivnih i represorskih formi; engl. *GLI-A (activator)/GLI-R (repressor) ratio*). Ekspresija GLI1 je pak regulirana tako da bude u ravnoteži s GLI2 i GLI3, no bitno je da može biti regulirana i putem drugih signalnih puteva poput TGF $\beta$  ili Ras/MAPK (engl. *Rat Sarcoma/Mitogen-Activated Protein Kinase*). Čini da je upravo to bitno u karcinogenezi gdje je pokazano da je uloga GLI1 važnija od njegovih homologa (207). Gubitak ili mutacije GLI3 uzrokuju malformacije udova u čovjeka (184). Činjenica da postoje različiti GLI proteini koji imaju različite uloge te različite mogućnosti interakcije s ostalim signalnim putevima čini samu Hh signalizaciju i njezine mogućnosti još kompleksnijima (121).

#### 1.4.1.6. SUFU

Praet je 1992. godine u mušice inaktivirao gen za polaritet segmenta (engl. *Segment polarity gen*) *Fu* te otkrio novi gen koji kodira novi protein na 3. kromosomu vinske mušice. S obzirom na to da je novi protein uspio povratiti fuzijski fenotip mušice čiji je gubitak bio posljedica mutacije s gubitkom funkcije (eng. *Loss-of function mutation*) *Fu* gena u mušice, novi gen je

prozvan *Suppressor of Fused (SUFU)* (208). Potom je uslijedilo više istraživanja strukture i funkcije te karakteristika SUFU koji je zatim nađen i opisan u sisavaca (209). Humani SUFU se javlja u dvije prekrajajuće izoforme (engl. *Splicing isoforms*), no još uvijek nisu nađene razlike u njihovoj funkciji (19). SUFU je u mušice kao i u čovjeka visoko konzerviran te se radi o monomeru sačinjenom od dviju globularnih domena - NTD (engl. *N-terminal domain*) i CTD (engl. *C-terminal domain*) s kratkom međusobnom poveznicom (210), a važnost poznavanja strukture SUFU tijekom interakcije s GLI proteinima je u tome što nam pruža uvid u način regulacije GLI proteina (20).

Uloga SUFU kao glavnog modulatora signalnog puta Hh je specifičnost u kralježnjaka. Naime, poznata nam je njegova sasvim periferna uloga u vinske mušice u koje su homozigoti za mutacije gena *SUFU* s gubitkom funkcije (engl. *Loss-of-function mutation*) žive mušice bez fenotipskih promjena, što ukazuje na to da SUFU u mušice ne igra značajnu ulogu u Hh signaliziranju (208). Istraživanjima na kralježnjacima, u zebrice i napose u miša, uočena je ključna uloga SUFU kao negativnog regulatora signalnog puta Hh, s obzirom da mutante za gen *SUFU* umiru još u embrionalno doba, sredinom gestacije (211,212). Primjerice, u miša gubitak ekspresije proteina SUFU dovodi do smrti još tijekom embrionalnog razdoblja s defektima razvoja glave i neuralne cijevi što pokazuje da je u sisavaca SUFU neophodan za normalnu Hh signalizaciju te uredan razvoj i preživljenje ploda (211,213).

SUFU je ključni negativni regulator signalnog puta Hh u sisavaca koji uspostavlja komunikaciju između SMO i GLI transkripcijskih faktora (19). Izravno se veže na GLI-FL u citoplazmi i sekvstrira ga čime sprječava njegovu nuklearnu translokaciju i prepisivanje ciljnih gena te dolazi do fosforilacije i prerade GLI-FL u GLI-R (214). Osim u citoplazmi, SUFU se nakuplja i u jezgri gdje se veže na GLI-vezujuće sekvence DNA molekula te sprječava transkripciju gena (169). Tako SUFU modulirajući lokalizaciju i stabilnost GLI proteina na dvije razine - u citoplazmi i u jezgri ostvaruje funkciju ključnog negativnog regulatora signalnog puta Hh (20).

Dok je uloga SUFU kao negativnog regulatora signalnog puta Hh interakcijom s GLI proteinima već poznata, mehanizam kojim je sam SUFU reguliran još ostaje uvelike nepoznat. Ipak, poznato je da tijekom aktivacije signalnog puta Hh preko PTCH-a dolazi do disocijacije SUFU-GLI kompleksa te se GLI oslobađa i prelazi u jezgru gdje potiče transkripciju ciljnih gena, dok se SUFU transportira izvan PC te dolazi do njegove razgradnje proteosom-ovisnim

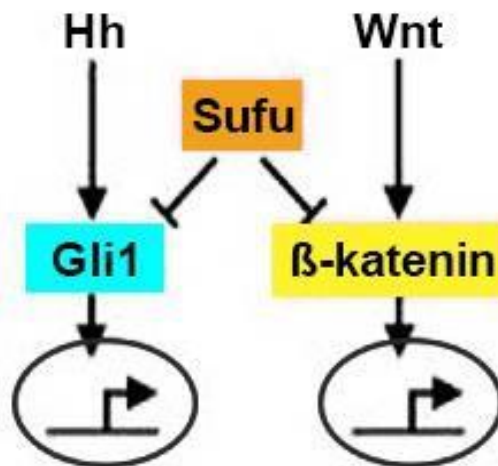
putem pomoću faktora koji nisu još istraženi. Također, Hh ligandi, naročito SHH, mogu samostalno potaknuti ubikvitin-proteosomalnim putem posredovanu degradaciju SUFU-a što upućuje na činjenicu da suvišak Hh liganda, primjerice u slučaju karcinogeneze, može dovesti do supresije djelovanja SUFU-a i deregulacije Hh signalizacije (20,215). Osim toga, čini se da je fosforilacija također bitna za regulaciju stabilnosti SUFU-a. Tako bi zapravo ubikvitinacija, koja je glavni put selektivne razgradnje proteina u stanici eukariota, kao i fosforilacija na posttranslacijskoj razini mogle modulirati stabilnost i time aktivnost SUFU-a. Ipak, postoji još niz nejasnoća vezano za sve aktere uključene u regulaciju SUFU-a te nema studija vezano za transkripciju gena *SUFU* (20). Također, mehanizam transporta SUFU-a iz citoplazme u jezgru stanice ostaje još nerazjašnjen, no postoje dokazi da se transport SUFU-a na relaciji citoplazma - jezgra odvija CRM-1 (engl. *Chromosomal Maintenance 1/Exportin-1*) posredovanim mehanizmom (216).

Smatra se da SUFU ima presudnu ulogu u održavanju homeostaze zdravog odraslog organizma. Naime, pokazano je da je gubitak funkcije SUFU bez ikakvog postojanja signala Hh liganda dovoljan za pokretanje samostalne Hh signalizacije (što također vrijedi i za PTCH1) (213). Tako je u kolorektalnom karcinomu, karcinomu prostate i glioblastomu nađen gubitak ekspresije proteina SUFU koji upućuje na važnost funkcije SUFU-a te na njegovu antiproliferacijsku ulogu (20). Presudna uloga aberantne aktivacije signalnog puta Hh te važnost izostanka funkcije SUFU-a zbog različitih mutacija proučena je na primjeru desmoplastičnog/nodularnog tipa meduloblastoma te je ustanovljeno da određene mutacije gena *SUFU* stvaraju povećanu sklonost razvoju tumora (217,218). U slučaju inaktivacije jednog od ključnih staničnih tumorskih antigena p53, nađeno je da bi upravo gubitak funkcije SUFU proteina mogao biti odlučujući korak u malignoj pretvorbi stanice (219). Uredna Hh, SHH i SUFU signalizacija imaju važnu ulogu i u sprečavanju akutne transplantacijske bolesti (engl. *Graft-versus-host disease*, GVHD) (220,221).

Istraživanja ukazuju na to da bi uloga proteina SUFU u signalnom putu Hh zapravo mogla biti tek jedna od njegovih uloga, s obzirom da je pokazano da bi SUFU mogao biti i regulator signalnog puta Wnt. Budući da su oba spomenuta puta ključna za proliferaciju i diferencijaciju stanica te za embriogenezu i s obzirom na činjenicu da oba puta mogu utjecati na iste stanice, SUFU bi mogao djelovati kao svojevrsni koordinator i poveznica u interakciji signalnih puteva Wnt i Hh, kako je nađeno u nižih kralješnjaka (21). Nadalje, pokazano je da se SUFU nalazi u

istom kompleksu sa  $\beta$ -kateninom te da djeluje kao negativni regulator signalnog puta Wnt (Slika 8). Naime, na humanim staničnim linijama uočeno je da povećana ekspresija SUFU dovodi do poticanja izlaska  $\beta$ -katenina iz jezgre preko CRM-1 i posljedično smanjene transkripcije TCF onkogenih ciljnih gena što dovodi do zaustavljanja rasta tumorskih stanica (216). Ipak, radova je na tom području još uvijek malo te su kontradiktorni (213).

Važnost Hh signalizacije tijekom embrionalnog razvoja i napose razvoja posteljice te time i SUFU kao njezina glavnog regulatora obrađena je u posebnom poglavlju. Iz svega navedenoga nameće se zaključak da je SUFU ključan kako za embriogenezu, tako i za homeostazu stanica i supresiju tumora (222).



**Slika 8.** Moguće interakcije signalnog puta Wnt i Hh preko SUFU. Preuzeto iz (21).

#### 1.4.2. Vrste signalnog puta Hh

U signalnom putu Hh, kao i u Wnt, postoji kanonski i nekanonski put. Kanonski put je onaj u kojemu Hh ligand regulira transkripcijske faktore GLI te preko njih ostvaruje svoj učinak. Kanonski put je do sada značajno više istražen u odnosu na nekanonski, s obzirom da je nađen u brojnim ključnim fiziološkim te patološkim procesima (karcinogeneza).

Do sada su otkrivena dva nekanonska signalna puta Hh, odnosno dva signalna puta koja su sasvim neovisna o GLI transkripcijskim faktorima. U prvom podtipu nekanonskog puta signalizacija Hh se odvija preko Hh liganda i PTCH-a, ali neovisna je o SMO-u. U slučaju odsustva vezivanja Hh liganda na PTCH, PTCH će kroz regulaciju staničnog ciklusa u G2/M fazi djelovati proapoptotski, dok će u slučaju vezivanja Hh liganda na PTCH receptor doći do pojačane proliferacije i preživljenja stanica (223). U drugom podtipu nekanonska signalizacija Hh je posredovano receptorom SMO neovisno o transkripcijskim faktorima GLI te se smatra važnim za regulaciju aktinskog citoskeleta i održavanje metabolizma, a pokazano je da se putem njega regulira i percepcija osjeta boli (224,225).

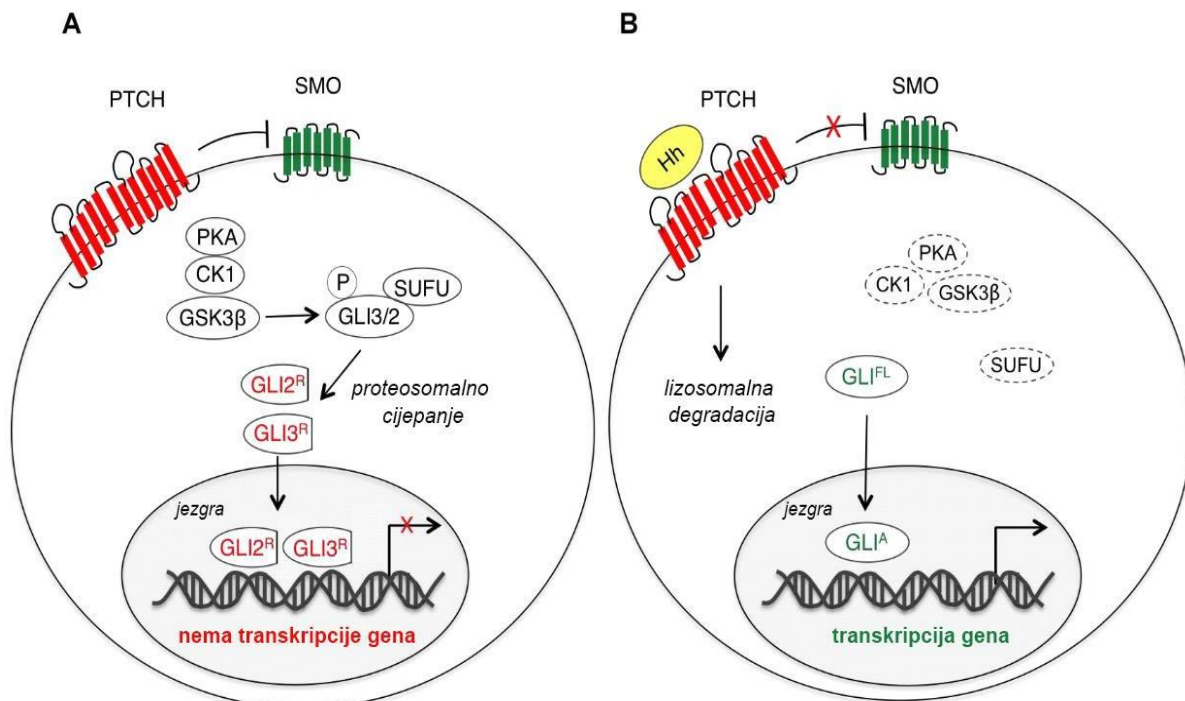
### 1.4.3. Hh signalizacija

Prvi uvjet za uspješnu Hh signalizaciju je prisutnost PC, s obzirom da je u sisavaca signalni put Hh ovisan o njima. PC su visoko specijalizirane stanične organele sastavljene od mikrotubula koji izlaze s površina mnogih stanica u kralježnjaka i koje su osjetljive na različite kemijske, toplinske ili mehaničke signale, a za čiju je normalnu strukturu i funkciju potrebno nekoliko stotina različitih proteina (226,227). PC se smatraju središnjim mjestima na kojima se odvija prijenos i prekid signala u signalnom putu Hh, a mutacije proteina koji izgrađuju PC dovode do gubitka Hh signalizacije (228). Upravo to je pokazano u bolestima koje nastaju kao posljedica defekta u cilijama, kao što su primjerice degeneracija retine, policistična bolest bubrega ili Kartagenerov te Bardet-Biedl sindrom (229).

Kanonski signalni put Hh može biti aktiviran putem sva tri Hh liganada (IHH, SHH i DHH) koji se vežu na transmembranski receptor PTCH. Ako ne dolazi do vezivanja Hh liganda za PTCH receptor, PTCH ulazi u PC i inhibira aktivnost susjednog transmembranskog proteina SMO tako da SMO ostaje izvan PC (230).

Transkripcijski faktor GLI-FL tvori kompleks sa SUFU koji ga zadržava u citoplazmi. SUFU uz KIF7 potiče fosforilaciju GLI-FL koju izvršavaju PKA (engl. *protein Kinase A*), GSK3 $\beta$  (engl. *Glycogen Synthase kinase 3 $\beta$* ) i CK1, a time nastaje GLI-R, oblik GLI koji inhibira transkripciju ciljnih gena (231) (Slika 9A).

Ako dođe do vezanja nekog od tri spomenuta Hh liganda na PTCH receptor, dolazi do izlaska receptora iz PC te razgradnje liganda i receptora u lizosomima, nakon čega se oslobađa integralni transmembranski protein SMO koji prelazi u aktivni oblik nakon fosforilacije od strane CK1 (engl. *Casein Kinase 1*) i GRK2 (engl. *G Protein-Coupled Receptor Kinase 2*). Aktivni SMO potom prelazi u PC u kojoj SUFU, KIF7 i GLI-FL sačinjavaju citoplazmatski kompleks. Međutim, aktivirani SMO potiče disocijaciju kompleksa SUFU-GLI te pretvorbu GLI-FL u GLI-A koji potom prelazi u jezgru te dovodi do prepisivanja ciljnih gena (232) (Slika 9B).



**Slika 9.** Shematski prikaz kanonskog puta Hh. Preuzeto i preuređeno iz (233). U odsustvu Hh liganda (A) PTCH inhibira SMO. SUFU načini kompleks s GLI-FL te ga stabilizira u citoplazmi. SUFU i KIF7 potiču fosforilaciju GLI2 i GLI3 od strane PKA, CK1 i GSK3 $\beta$ , zbog čega dolazi do njihove djelomične proteosomalne degradacije i do formacije represorske forme GLI-R koja se translocira iz citoplazme u jezgru stanice gdje inhibira transkripciju ciljnih gena.

U slučaju vezanja Hh liganda (B) za PTCH receptor, dolazi do oslobađanja SMO te fosforilacije, nakon čega se SMO aktivira i potiče signalnu kaskadu koja dovodi do pretvorbe GLI-FL u aktivnu formu GLI-A koja se prenosi u jezgru i potiče transkripciju ciljnih gena.

#### 1.4.4. **Moguće poveznice i interakcije između signalnih puteva Wnt i Hh**

Osim SUFU, nađeno je još nekoliko razina na kojima bi mogle postojati interakcije između signalnih puteva Hh i Wnt što još više dočarava složenost i međusobno precizno podešavanje i interakcije. Primjerice, nađeno je da je IHH eksprimiran u epitelnim stanicama kolona te da je važan za njihovu diferencijaciju, a ujedno u tim stanicama djeluje i kao negativni regulator, antagonist kanonskog signalnog puta Wnt inhibirajući  $\beta$ -katenin-TCF signalizaciju, dok istovremeno povratno kanonski put Wnt negativno utječe na ekspresiju IHH što govori u prilog međusobnom podešavanju i ravnoteži između puteva. U slučaju izostanka te ravnoteže, odnosno u slučaju izostanka Hh signalizacije, doći će do pojačane aktivacije signalnog puta Wnt prisutne primjerice u kolorektalnom karcinomu (234).

Također, pokazano je da u kralježnjaka u različitim okolnostima GLI proteini mogu regulirati ekspresiju različitih *WNT* gena te tako utjecati na Wnt signalizaciju. Ujedno, u slučaju blokiranja Wnt signala ne može doći do GLI2/3 posredovane signalizacije. Tako je nađeno da u stanicama ranoga embrija GLI2 može direktno potaknuti ekspresiju gena *WNT8*, te se smatra da bi mogao biti jedan od ključnih regulatora *WNT8* signalizacije. GLI2/3 također može indirektno potaknuti ekspresiju gena *WNT5A*, *WNT7B* i *7C* te *WNT8B* i *WNT11* tijekom rane embriogeneze, dok GLI1 može inducirati ekspresiju *PTCH1* te pojačanu ekspresiju (engl. *Upregulation*) gena *WNT5A*, *WNT7B* i *C* te *WNT8*. U tumorskom tkivu je pak nađeno da GLI1 uzrokuje smanjenu ekspresiju gena *WNT2*, *WNT3*, *WNT5A*, *WNT7B* i *WNT11* te *GLI2*, *GLI3* i *PTCH* (235).

Iz svega navedenoga može se naslutiti koliko je mogućih poveznica i višestrukih interakcija (engl. *Cross-talk*) između signalnih puteva Hh i Wnt što nam daje uvid u složenost ovih puteva i njihove moguće regulacije.

#### 1.4.5. **Signalni put Hh i posteljica**

Signalni put Hh je ključan za regulaciju proliferacije i diferencijacije stanica, organogenezu te nastanak i potom i progresiju karcinoma, a presudan je i za razvoj i održanje uredne trudnoće (14).



Naime, signalni put Hh ima važnu ulogu u reguliranju hematopoeze te u procesima vaskulogeneze i angiogeneze u posteljici tijekom embrionalnog razvoja. Utvrđeno je da može izravno poticati stvaranje endotelnih stanica krvnih žila te potaknuti potporne stanice krvnih žila na proizvodnju vaskularnih faktora rasta, čime može regulirati kako nastanak tako i daljnji razvoj postojećih krvnih žila (15,16). Primjerice, pokazano je da inhibicija SHH signalizacije smanjuje ekspresiju VEGF-A (engl. *Vascular endothelial growth factor A*) u stanicama trofoblata (236,237). Poremećaj Hh signalizacije dovodi do poremećene vaskulogeneze u žumanjčanoj vreći te posljedično do poremećaja razvoja labirinta posteljice u miša zbog čega dolazi do drastičnog smanjenja kapaciteta trasplacentarne izmjene tvari ključne za održanje i napredovanje trudnoće, odnosno rast i razvoj ploda (200).

Poremećena signalizacija signalnog puta Hh inhibira migraciju i invaziju stanica trofoblata i angiogenezu u posteljici, čime dovodi do smanjene vaskularizacije te posljedično povećane hipoksije i ugroze ploda (204).

Na eksperimentalnom modelu miša nađeno je da je uredna razina SMO-a u endometralnoj stromi neophodna tijekom implantacije te da izostanak Hh signalizacije ovisne o SMO-u prolongira implantaciju i dok je embrionalni razvoj do trenutka implantacije uredan (238). Osim toga, pokazano je da u žena s habitualnim pobačajem postoji smanjena SHH signalizacija u posteljici te da inhibicija SHH dovodi do pojačane autofagije (236). To je važno stoga što se smatra da bi upravo interakcija između SHH i autofagije mogla biti važna za održanje trudnoće s obzirom da je autofagija vrlo aktivna u stanicama EVT-a u posteljici te da je poremećaj autofagije važan u patogenezi preeklampsije i IUGR-a (239). Naime, autofagija pridonosi razvojnim procesima i očuvanju homeostaze kroz proces lizosomalne degradacije. Nađeno je da signalni put Hh može biti i pozitivni i negativni regulator autofagije, ovisno o vrsti stanica i vremenu djelovanja (236).

Osim SHH, mnoge komponente signalnog puta Hh, poput GLI2 i GLI3, obilno su eksprimirane u tkivu trofoektoderma, a potom i u trofoblastu posteljice te su potrebne za uredan razvoj posteljice i održanje trudnoće (237). Hh signalizacija preko GLI1/2 potiče diferencijaciju CTB-a i proces EMT stanica trofoblata neophodnih za uspješnu placentaciju, dok protein GLI2 osigurava fuziju stanica citotrofoblata u sinciotrofoblast (17,18). GLI1 potiče transkripciju ključnih regulatora EMT kao što su Snail1, Slug i Twist. Međutim, GLI1 i GLI2 također mogu djelovati i kao transkripcijski represori gena koji kodira E-kadherin što čini Hh signalizaciju

preko GLI1/2 neophodnom za fiziološki razvoj zrele posteljice te je pokazano da gubitak GLI2 uzrokuje smrt embrija (18,184).

## **1.5. VAŽNOST POJEDINIH EPIGENETSKIH MEHANIZAMA U POSTELJICI**

Epigenetika se definira kao područje biologije u kojem se proučavaju promjene genske ekspresije koje nisu uzrokovane promjenom DNA slijeda (grč. *Επί* - izvan, iznad, oko) (240). U današnje vrijeme se naša pažnja uvelike premješta s DNA slijeda upravo na regulaciju i promjenu genske ekspresije postojećih DNA sljedova utjecajem različitih faktora iz okoliša, što predstavlja veliki izazov jer njezini različiti mehanizmi omogućuju promjene u genskoj ekspresiji koje su nasljedne, no sasvim neovisne o DNA slijedu te ga ne mijenjaju (241). Kada se u tom kontekstu proučava razvoj ploda i posteljica, govorimo o fetalnom programiranju (242). Posteljica tako pod utjecajem vanjskih faktora može mijenjati svoje funkcije putem različitih epigenetskih mehanizama. Pokazano je da i fetalni rast može biti moduliran putem epigenetskih mehanizama (2). Epigenetska regulacija ostvaruje se preko DNA metilacije, posttranslacijske modifikacije histona i djelovanja nekodirajućih RNA - mikro-RNA (miRNA/miR) i dugih nekodirajućih RNA (engl. *Long noncoding RNAs*).

S obzirom na to da je uočena povezanost epigenetske regulacije različitih gena u posteljici s fiziološkim razvojem posteljice i urednim fetalnim rastom (243), u našem je istraživanju proučavana DNA metilacija i miRNA, pa je stoga potrebno predstaviti njihov mehanizam i ulogu u posteljici.

### **1.5.1. DNA metilacija i njezina uloga u posteljici**

DNA metilacija je najviše proučeni način epigenetske regulacije (240). To je proces u kojem enzim DNA metiltransferaza (engl. *DNA methyltransferase*, DNMT) dodaje metilnu skupinu na citozinski prsten u CpG dinukleotidima (244).

Osim CpG dinukleotida postoje i CpG otoci na koje otpada između 1 i 2% genoma i koji se često nalaze u regijama promotora aktivnih gena. Naime, u slučaju metilacije citozina CpG otoka promotorske regije gena, gen postaje metiliran što znači da ga transkripcijski faktori neće prepoznati pa će transkripcija izostati (245). Tada kažemo da je gen „utišan“. Naprotiv, u slučaju da ne dođe do metilacije citozina u CpG otocima promotora, bit će omogućena transkripcija jer gen nije „utišan“ s obzirom da je nemetiliran. CpG dinukleotidi izvan CpG otoka obično su metilirani, čime pak pridonose stabilnosti i očuvanju genoma (244).

Nakon oplodnje dolazi do globalne demetilacije koja traje do stadija morule, odnosno 3. dan nakon oplodnje. Međutim, između implantacije i gastrulacije, u vrijeme kada počinje diferencijacija stanica, dolazi do *de novo* metilacije i uspostave novih metilacijskih obrazaca u plodu koji se razvija i koji će u normalnim uvjetima postojeće obrasce zadržati ostatak svog života (246,247). Naime, tada se uspostavljaju dvije različite stanične linije, kako je već ranije napomenuto; unutarnja (engl. *Inner cell mass*) iz koje će nastati sva tkiva zametka postaje hipermetilirana, dok vanjska (engl. *Outer cell mass*), trofoektoderm, iz kojeg će nastati posteljica, postaje hipometilirana (248,249).

Odnos relativno hipermetiliranih embrionalnih tkiva početkom trudnoće u odnosu na hipometilirana ekstraembionalna tkiva posteljice zadržava se i tijekom ostatka trudnoće (249). Pokazano je da se tijekom diferencijacije stanica u embriogenezi upravo moduliranjem metilacije postiže prepisivanje odnosno utišavanje ciljnih gena čime metilacija promotora postaje jedan od ključnih mehanizama tijekom diferencijacije stanica (250).

Nadalje, smatra se da DNA metilacija ima ključnu ulogu u razvoju posteljice te da promjene u obrascima metilacije mogu dovesti do poremećaja morfologije posteljice i nepovoljnog ishoda trudnoće (2). Vrijeme demetilacije, a potom uspostave novih metilacijskih obrazaca tijekom ranog razvoja ploda smatra se ključnim za preživljenje i uredan razvoj ploda, a upravo tijekom tog razdoblja na epigenetsku regulaciju mogu utjecati vanjski faktori, čime mogu dugoročno izmijeniti gensku ekspresiju ploda (242). Na modelima posteljice u štakora pokazano je da u slučaju blokade DNA metilacije dolazi do potpunog poremećaja razvoja labirinta i posteljice (251,252). Na humanim staničnim linijama blokada DNA metilacije dovodi do poremećene migracije trofoblasta (202). Osim toga, pokazano je da u zametaka koji ne mogu održati normalan stupanj metilacije dolazi do smrti nakon gastrulacije (247).

DNA metilacija može dovesti do smanjene ekspresije gena koji su ključni kako za razvoj posteljice, tako i za njezine metaboličke i endokrine zadaće, što posljedično negativno utječe na rast ploda. Tako je, primjerice, u humanim posteljicama iz trudnoća s IUGR-om uočena pojačana metilacija gena *HSD11B2* presudnog za metabolizam glukokortikoida (253,254).

Na fetalni rast utječu i brojni geni koji su podložni različitim vrstama epigenetske kontrole. Naime, proučavanjem različitih gena u posteljici koji su odgovorni za rast nađeno je da su neki od tih gena, primjerice *WNT2*, regulirani DNA metilacijom te povezani s IUGR-om (255). Isto je potvrđeno u drugom istraživanju gdje je uočeno da je pojačana metilacija u području promotora gena *WNT2* dovela do smanjene proteinske ekspresije *WNT2* u posteljici te smanjene porođajne mase djeteta (256).

Osim toga, pokazatelj da bi promjene u DNA metilacijskom profilu posteljice mogle biti marker fetalnog rasta, jest činjenica da je nađen obrazac metilacije na 22 ključna lokusa u terminskim posteljicama. Naime, promjena metilacije u tim ciljnim genima povećava vjerojatnost nastanka IUGR-a (257). Zbog svega navedenoga ne čudi činjenica da posteljica ima veliku varijabilnost u DNA metilaciji u usporedbi s drugim tkivima te se vjeruje da bi uzrok tome mogao biti baš u njezinoj prilagodbi potrebama majke i ploda te uvjetima iz okoliša koji ih okružuje.

### **1.5.2. Mikro RNA i njezina uloga u posteljici**

Nizom istraživanja je potvrđeno da osim DNA metilacije postoje i drugi epigenetski mehanizmi koji su vrlo važni u regulaciji ekspresije različitih gena u posteljici.

MikroRNA su male nekodirajuće RNA koje se sastoje od 18 - 22 nukleotida. One reguliraju stabilnost i translaciju mRNA te su značajne po tome što samo jedna miRNA može regulirati ekspresiju više različitih gena (258). Pokazano je da bi miRNA mogla imati vrlo značajnu ulogu u razvoju posteljice kroz regulaciju posteljičnih gena. Naime, nađeno je da miRNA djeluje na proliferaciju stanica trofoblasta, njihovu migraciju, invaziju i apoptozu te da je važna za angiogenezu (259). Tako su istraživanja pokazala promijenjene ekspresije specifičnih miRNA

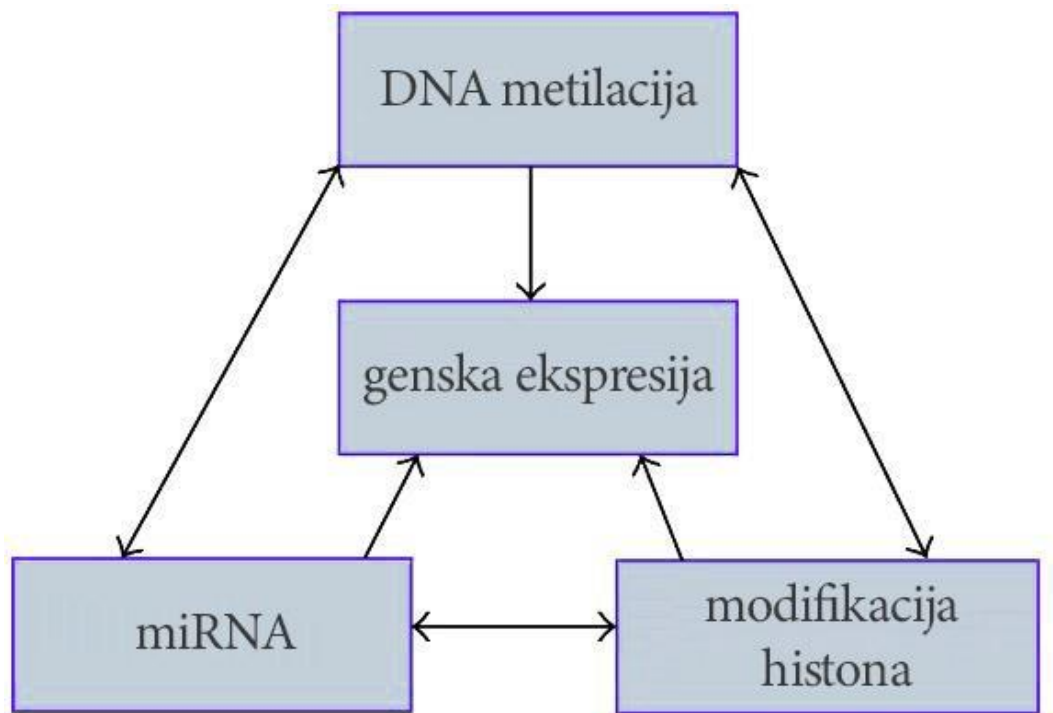
u posteljicama iz trudnoća s preeklampsijom u odnosu na njihovu ekspresiju u posteljicama iz urednih trudnoća (260,261).

Promijenjena koncentracija kisika mogla bi imati utjecaja na epigenetske i genetske kontrolne mehanizme uključene u razvoj posteljice te time i u preživljenje i razvoj ploda (242). Naime, pokazano je da se upravo pod utjecajem promijenjene razine kisika mijenja i ekspresija pojedinih miRNA u stanicama trofoblasta humane posteljice, tako da je u slučaju hipoksije ona u pojedinih miRNA pojačana (engl. *Upregulation*), dok je u drugih smanjena (engl. *Downregulation*), a na pojedine razina kisika nema utjecaja. Vjeruje se da bi to mogao biti epigenetski mehanizam u pozadini smanjene ponude kisika plodu, napose u vremenu rane trudnoće kada se oblikuju *de novo* obrasci metilacije (231). To je vrlo značajno saznanje u kontekstu posteljične insuficijencije i posljedično razvoju IUGR-a koji su predmet našeg istraživanja.

S obzirom na to da su različite posteljične miRNA detektabilne u serumu trudnica mogle bi u budućnosti poslužiti kao mogući markeri za prisustvo ili progresiju različitih nepovoljnih stanja ili bolesti koje bi mogle ugroziti plod te bi mogle služiti kao svojevrsni rani indikatori izloženosti ploda nepovoljnim uvjetima iz okoliša (242). Iz svega navedenoga slijedi da bi različite miRNA i poznavanje molekularnih mehanizama koji su u podlozi patoloških procesa u posteljici mogli poslužiti za izradu novih markera bolesti i mogućih novih lijekova te planiranja preventivnih postupaka u trudnoći.

Osim DNA metilacije i miRNA, nađeno je da je i post-translacijska modifikacija histona važan način regulacije ekspresije posteljičnih gena te da bi ona mogla biti jedan od faktora koji omogućuje fetomaternalnu imunološku toleranciju (262,263). Modifikacija histona mogla bi također biti važan regulator ekspresije ključnih posteljičnih gena koji omogućuju fuziju trofoblasta (264).

Da bi se dobilo dodatni uvid u kompleksnost epigenetskih mehanizama i njihove genske regulacije, potrebno je naglasiti da bi spomenuti mehanizmi mogli imati i međusobne interakcije koje bi također mogle modificirati njihov utjecaj na gensku ekspresiju što dodatno pridonosi složenosti njihova djelovanja (265) (Slika 10).



**Slika 10.** Višestruke moguće međusobne interakcije između epigenetskih mehanizama. Preuzeto i preuređeno iz (265).

## 2. HIPOTEZA

U posteljicama s intrauterinim zastojem u rastu u usporedbi s posteljicama iz urednih trudnoća, očekuje se smanjena ekspresija proteina WNT5A i  $\beta$ -katenina te povećana ekspresija proteina SUFU, dok će promotor gena *SUFU* biti hipometiliran.

### 3. CILJEVI

#### Opći cilj:

Istražiti promjene u ekspresiji proteina WNT5A,  $\beta$ -katenina i SUFU u posteljicama s intrauterinim zastojem u rastu te ih usporediti s njihovom ekspresijom u posteljicama iz urednih trudnoća.

#### Specifični ciljevi:

1. Ispitati razinu ekspresije proteina WNT5A i  $\beta$ -katenina, pozitivnih regulatora signalnog puta Wnt
2. Ispitati razinu ekspresije proteina SUFU, negativnog regulatora signalnog puta Hh i moguće signalnog puta Wnt
3. Analizirati metilaciju DNA u promotoru gena *SUFU*
4. Odrediti povezanost DNA metilacije gena *SUFU* s njegovom proteinskom ekspresijom
5. Usporediti ekspresiju proteina WNT5A,  $\beta$ -katenina i SUFU u zdravim i posteljicama s intrauterinim zastojem u rastu
6. Ispitati je li ekspresija gena *SUFU* regulirana putem miR-214-3p i miR-378a-5p.



## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Klinički podaci

Uzorci posteljica korištenih u istraživanju dio su zbirke posteljičnog tkiva koje pripada Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te Kliničkoj bolnici Merkur, odnosno Klinici za ženske bolesti i porode pri toj ustanovi, a obje su institucije dio Centra za izvrsnost u reproduktivnoj i regenerativnoj medicini (engl. *Scientific Center of Excellence for Reproductive and Regenerative Medicine*, CERRM). Istraživanje je odobreno od strane Središnjeg etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (641-01/22-02/01; 30. listopada 2018.) i Etičkog povjerenstva KB Merkur (03/1-1341; 14. veljače 2018.).

Kontrolnu grupu sačinjavalo je 18 uzoraka posteljica fiksiranih formalinom i uklopljenih u parafin (engl. *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*, FFPE) koji su dobiveni iz fizioloških jednoplodnih terminskih trudnoća (porođaj između navršenog 38. tjedna gestacije te prije navršenog 42. tjedna gestacije) iz kojih je porođeno dijete uredne porođajne mase (iznad 10. centile, a ispod 90. centile za gestacijsku dob, spol djeteta i paritet majke).

Ispitivanu skupinu sačinjavala su 34 uzorka posteljica dobivenih također iz terminskih jednoplodnih trudnoća s IUGR-om dijagnosticiranim na temelju serijskih (barem dva) ultrazvučnih mjerenja BPD, AC te FL, prema kojima je procijenjena masa ploda bila ispod 10. centile za gestacijsku dob, spol djeteta i paritet majke prema nacionalnim tablicama definiranim 1988. godine što je i potvrđeno mjerenjem mase novorođenčeta neposredno nakon porođaja (266).

Jedina patologija trudnoće prisutna u ispitivanoj skupini bila je IUGR, a isključni kriteriji za patološke kao i za kontrolne trudnoće bili su: višeplodna trudnoća, intrauterine virusne infekcije (TORCH i Parvovirus B19), korioamnionitis, hipertenzija, preeklampsija, fetalne malformacije i genetske abnormalnosti, autoimune bolesti majke, pušenje cigareta te konzumiranje nedopuštenih supstanci u trudnoći ili poremećaji prehrane u majke.

Nakon porođaja, posteljice iz obje skupine poslane su na patohistološku analizu uz prethodni usmeni i pismeni informirani pristanak roditelja. Certificirani patolog (A.Š.) je potom učinio makroskopsku i patohistološku analizu posteljičnog tkiva iz obje skupine te potvrdio promjene

na razini posteljice koje su u skladu s kliničkom dijagnozom IUGR-a, odnosno potvrdio uredan nalaz u slučaju kontrolne skupine. Potom je od svake posteljice, oko 5 cm od insercije pupkovine, uzet uzorak čitave debljine tkiva posteljice (od fetalne do maternalne strane) u obliku diska koji je potom rutinskim laboratorijskim tehnikama uklopljen u parafinske blokove.

## 4.2. METODE

### 4.2.1. Imunohistokemija

Uzorci posteljica iz ispitivane i kontrolne skupine fiksirani su formalinom i uklopljeni u parafin rezani su na debljinu od 4  $\mu$ m te postavljeni na silanizirana predmetna stakla (DakoCytomation, Denmark). Narezani FFPE-uzorci inkubirani su preko noći u termostatu pri 58 °C. Sljedeći dan, uzorci su izvađeni iz termostata te ostavljeni 10 min pri sobnoj temperaturi da se ohlade.

Da bi se provela imunohistokemijska analiza kojom je detektirana proteinska ekspresija i lokalizacija proteina WNT5A,  $\beta$ -katenina i SUFU u uzorcima, bilo je potrebno deparafinizirati i rehidrirati tkivo. Tako su FFPE-uzorci deparafinizirani u ksilenu (BioGnost) četiri puta po 10 min, rehidrirani u padajućim koncentracijama etanola (100%-tni etanol 5 min, 96%-tni etanol 5 min i 70%-tni etanol 2 min; Kemika, Zagreb, Hrvatska) te potom dva puta isprani u destiliranoj vodi.

Deparafinizirani i rehidrirani uzorci su potom zagrijavani u citratnom puferu, Dako Target Retrieval Solution (pH 6; Dako, Carpinteria, CA, SAD), u kuhu na paru 20 min radi razotkrivanja epitopa. Zatim su uzorci prebačeni u posudu s mlakom vodom tokom 25 min da bi se postepeno ohladili, nakon čega su isprani dva puta po 3 min u 1  $\times$  TBS-puferu (engl. *Tris-Buffered Saline*; 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl). Kako bi se blokiralo djelovanje endogenih peroksidaza, uzorci su tretirani 3%-tnom otopinom peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; BioGnost) u trajanju od 10 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je slijedilo ispiranje u 1  $\times$  TBS-puferu dva puta po 3 min. Nakon ispiranja, na uzorke je dodano primarno protutijelo, optimalno razrijeđeno u 1  $\times$  TBS-puferu. Uzorci su ostavljeni preko noći u vlažnoj komori na 4 °C.

Korištena su primarna protutijela: anti-WNT5A mišje monoklonalno (engl. *Mouse monoclonal anti-human*; ab86720, Abcam, Cambridge, UK, razrjeđenje 1:1000), potom anti- $\beta$ -katenin zečje poliklonalno (engl. *Rabbit polyclonal anti-human*; ab16051, Abcam, Cambridge, UK, razrjeđenje 1:500) i anti-SUFU zečje poliklonalno protutijelo (engl. *Rabbit polyclonal anti-human*; 26759-1-AP, Proteintech, Rosemont, IL, USA, razrjeđenje 1:500).

Sljedećeg dana uzorci su isprani u 1 x TBS-puferu dva puta po 3 min, nakon čega je na njih dodano sekundarno protutijelo (Dako REAL EnVision Detection System), peroksidazom konjugirana polimerna okosnica koja na sebi nosi i molekule sekundarnog protutijela. Sekundarno protutijelo veže se na mišje ili zečje imunoglobuline primarnog protutijela te dolazi do detekcije primarnog protutijela. Inkubacija u sekundarnom protutijelu odvijala se pri sobnoj temperaturi u trajanju od 30 min. Uzorci su potom isprani u 1 x TBS-puferu dva puta po 3 min. Potom je uslijedila inkubacija u 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) u trajanju od 10 min pri sobnoj temperaturi. Primjena ovog supstrat-kromogen kompleksa rezultirala je nastajanjem netopivog smeđeg precipitata na antigenskom mjestu. Uzorci su zatim isprani prvo u vodovodnoj pa onda u destiliranoj vodi, nakon čega su kontrastirani hematoksilinom (BioGnost) tijekom 1 min, a višak boje ispiran je u vodovodnoj vodi tokom 5 min. Uzorci su potom dehidrirani u rastućim koncentracijama etanola (70%-tni etanol nekoliko urona, 96%-tni etanol nekoliko urona, 100%-tni etanol 1 min i 100%-tni etanol 2 min), nakon čega je slijedilo bistrenje u ksilenu dva puta po 5 min. Uzorci su naposljetku trajno uklopljeni u medij za uklapanje (Biomount DPX Low, BioGnost).

Negativna kontrola tokom istraživanja bio je uzorak obrađen na isti način kao ispitivana i kontrolna skupina, ali bez inkubacije u primarnom protutijelu. Kao pozitivne kontrole korišteni su humani uzorci tonzila (za WNT5A), kolona (za  $\beta$ -katenin) i bubrega (za SUFU).

Proteinska ekspresija WNT5A,  $\beta$ -katenina i SUFU promatrana je u trofoblastu, endotelnim stanicama te u stromalnim stanicama posteljice u kontrolnoj i ispitivanoj (IUGR) skupini od strane dva neovisna patologa. Semikvantitativna analiza proteina očitana je pomoću svjetlosnog mikroskopa sa svijetlim vidnim poljem (Olympus CX22; Olympus Life Science, Tokyo, Japan) prema sljedećim kriterijima: 0 – nema bojenja, odnosno nema ekspresije u stanicama, 1 – ako je < 10% stanica imunopozitivno, 2 – ako je 10- 50% stanica imunopozitivno i 3 – ako je > 50% stanica imunopozitivno (267).

#### 4.2.2. Izolacija genomske DNA iz FFPE-tkiva

Genomska DNA izolirana je iz FFPE-uzoraka posteljica iz kontrolne skupine koja je sadržavala 14 uzoraka, te iz 10 uzoraka posteljica iz ispitivane, IUGR, skupine. Genomska DNA iz FFPE-tkiva izolirana je po protokolu prilagođenom prema Vrsalović i sur. (268). Za izolaciju DNA korištena su dva reza debljine 10  $\mu\text{m}$  svakog FFPE-uzorka. Narezani uzorci su potom prebačeni u mikroeprevete volumena 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). U svaku mikroeprevetu je potom dodano po 1 mL supstitucije za ksilen (Histoclear II; National Diagnostics, Hessle Hull, UK), nakon čega su uzorci inkubirani 30 min pri sobnoj temperaturi uz miješanje okretanjem mikroepreveta. Uzorci su potom centrifugirani pri sobnoj temperaturi tijekom 5 min pri 13000 rpm (engl. *Revolutions per minute*). Supernatant je pažljivo uklonjen pomoću mikropipete, a na talog je potom dodano 1 mL supstitucije za ksilen. Potom su uzorci ponovno inkubirani i centrifugirani pod ranije opisanim uvjetima. Supernatant je opet pažljivo uklonjen, a na talog je dodano 500  $\mu\text{L}$  apsolutnog etanola (Kemika). Uzorci su potom miješani okretanjem mikroepreveta tijekom 2 min te potom centrifugirani pri sobnoj temperaturi tokom 5 min pri 13000 rpm. Supernatant je potom ponovno pažljivo uklonjen, a na talog ponovno dodano 500  $\mu\text{L}$  apsolutnog etanola. Uzorci su potom iznova pomiješani i centrifugirani već ranije opisanim načinom. Cijeli supernatant je potom pažljivo uklonjen, a mikroeprevete su ostavljene otvorene kako bi etanol ispario. Na talog je dodano 100  $\mu\text{L}$  digestijskog pufera (50 mM Tris pH 8,5, 1 mM EDTA, 0,5% Tween 20) i 4  $\mu\text{L}$  proteinaze K (20 mg/mL; VWR Life Science AMRESCO, Radnor, PA, SAD), nakon čega su uzorci inkubirani u termomikseru (Eppendorf) preko noći uz miješanje pri 300 rpm i temperaturi od 37 °C.

Sljedećeg dana, uzorci su centrifugirani pri sobnoj temperaturi tokom 30 s pri 13000 rpm, nakon čega je uslijedila inkubacija u termomikseru (bez miješanja) tijekom 8 min pri 95 °C radi inaktivacije proteinaze K. Uzorci su potom nanovo centrifugirani pri sobnoj temperaturi u trajanju od 30 s pri 13000 rpm. Supernatant je pažljivo uklonjen, a izolirana genomska DNA iz supernatanta pročišćenja je pomoću kita NucleoSpin gDNA Clean-up (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka) prema uputama proizvođača. Čistoća i koncentracija izolirane DNA izmjerene su pomoću mikrovolumnog spektrofotometra (NanoDrop 2000; Thermo Fisher Scientific). Uzorci izolirane genomske DNA potom su pohranjeni pri 4 °C.

### 4.2.3. PCR ovisan o metilaciji

Genomska DNA izolirana je iz FFPE-uzoraka tkiva posteljice iz IUGR i kontrolnih, urednih, trudnoća te bisulfitno konvertirana pomoću kita MethylEdge Bisulfite Conversion system (Promega Madison, Wisconsin, SAD) prema uputama proizvođača. Bisulfitno konvertirana DNA je potom korištena u reakcijama PCR-a (engl. *Polymerase Chain Reaction*) ovisnog o metilaciji (engl. *Methylation-specific PCR*; MSP). Sekvence početnica (engl. *Primer*) za promotorsku regiju gena *SUFU* navedene su u Tablici 1. Reakcije MSP-a provedene su pomoću kita TaKaRa EpiTaq HS (za bisulfitno tretiranu DNA) (TaKaRa Bio, Kusatsu, Shiga, Japan). Reakcijska smjesa za MPS sadržavala je 1XEpiTaq PCR pufer (bez  $Mg^{2+}$ ), 2,5 mM  $MgCl_2$ , 0,3 mM dNTP-a, 10 pmol svake početnice (Sigma-Aldrich), 25 ng DNA kalupa i 0,75 jedinica TaKaRa EpiTaq HS DNA polimeraze u 25  $\mu$ L konačnog volumena reakcijske smjese.

Reakcija se odvijala u sljedećim uvjetima: početna denaturacija tijekom 30 s pri temperaturi 95 °C, nakon čega je slijedilo 40 ciklusa koji su se odvijali u tri koraka: 30 s početne denaturacije pri 95 °C, potom je slijedilo sparivanje početnica s kalupom pri odgovarajućoj temperaturi tijekom 30 s i produljivanje lanca DNA pri temperaturi od 72 °C tijekom 30 s.

Potom je slijedilo završno produljivanje lanaca DNA pri 72 °C tijekom 7 min. Kod metilirane reakcije, temperatura sparivanja početnica s kalupom DNA (engl. *annealing temperature*) iznosila je 58 °C, dok je kod nemetilirane reakcije iznosila 55 °C. Uspješnost MSP reakcije provjerena je pomoću elektroforeze u gelu agaroze. Za razdvajanje produkata MSP-a korišten je 2%-tni agarozni gel (Lonza, Rockland, Inc. Rockland, USA) u koji je prethodno dodana boja GelStar nucleic acid stain (Lonza).

Veličina umnoženih fragmenata određena je prema standardu DNA (SimplyLoad 100 bp DNA Ladder; Lonza). Elektroforeza se odvijala u 1  $\times$  TAE-puferu (engl. *Tris-Acetate-EDTA*) (Bio-Rad) tijekom 30 min pri 120 V. Umnoženi fragmenti vizualizirani su pod UV svjetlom na transiluminatoru.

Sve MSP reakcije imale su kontrole, pa je tako Methylated Human Control (Promega) korištena kao pozitivna kontrole za metiliranu reakciju, dok je nemetilirana DNA EpiTact Control DNA (Quigen, Hilden, Njemačka) korištena kao pozitivna kontrola za nemetiliranu reakciju. Kao negativna kontrola, kod obje reakcije, korištena je voda bez nukleaza.

#### 4.2.4. RNA ekstrakcija

Za mRNA analizu bilo je potrebno izolirati ukupnu RNA iz FFPE-uzoraka posteljica debljine 5  $\mu\text{m}$  iz kontrolne skupine koja se sastojala od 14 uzoraka, te iz IUGR skupine koja se također sastojala od 14 uzoraka. Da bi se to moglo učiniti, prvo je bilo potrebno sve preparate deparafinizirati inkubacijom u 1 mL ksilena (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) tokom 3 min pri temperaturi od 50 °C, te potom centrifugirati 3 puta po 5 min pri sobnoj temperaturi 12000 x g.

Potom je odbačen supernatant, a dobiveno tkivo je ispirano tri puta s 1 mL apsolutnog etanola i potom preko noći inkubirano pri temperaturi od 55 °C u 350  $\mu\text{L}$  digestijskog pufera s proteinazom K (20 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 0,5% natrijeva dodecil sulfata i 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  proteaze K; svi reagensi su iz Sigma-Aldrich; Merck KGaA). Ukupna RNA je izolirana korištenjem TRIzol® reagensa (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) prema uputama proizvođača. Čistoća i količina ekstrahirane ukupne RNA provjerena je korištenjem mikrovolumnog spektrofotometra NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

#### 4.2.5. Reverzna transkripcija i kvantitativna lančana reakcija polimerazom (engl. *RT-qPCR*)

Iz svakog uzorka uzet je po 1 µg ukupne RNA i reverzno prepisan pomoću kita za reverznu transkripciju cDNA visokog kapaciteta (engl. *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit*; Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) prema uputama proizvođača. Razine mRNA ekspresije ciljanih gena (*CTNNB1*, *WNT5A* i *SUFU*) određene su CFX-96-real-time qPCR sistemom detekcije (engl. *CFX-96-real-time qPCR detection system*; Bio-Rad Laboratories, Inc.). Sve qPCR reakcije izvedene su u triplikatima korištenjem TB Green™ Premium Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus PCR master mix; Takara Biotechnology Co., Ltd.).

Korišteni su sljedeći termociklički uvjeti: početna denaturacija pri 95 °C tijekom 30 s, nakon čega je slijedilo 40 ciklusa pri temperaturi od 95 °C tokom 5 s te 60 °C tijekom 30 s. CFX96 upravljački softver verzije 3.1. (engl. *CFX96 manager software version 3.1.*; Bio-Rad Laboratories, Inc.) je korišten za generiranje vrijednosti praga ciklusa i podaci su analizirani korištenjem  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  metode (269).

Razine ekspresije relativne mRNA *CTNNB1*, *WNT5A* i *SUFU* normalizirane su prema mRNA razinama ekspresije gena gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (engl. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) koji je služio kao endogena kontrola. Specifičnost qPCR amplifikacije potvrđena je korištenjem analizom krivulje taljenja (engl. *Melting curve analysis*). Početnice korištene za mRNA analizu navedene su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Sekvence početnica korištene za PCR ovisan o metilaciji i reverznu transkripciju kvantitativne lančane reakcije polimerazom.

| Ciljani gen              | Referentni broj | Prednja početnica (5'-3') | Stražnja početnica (5'-3') | Duljina produkta (pb) |
|--------------------------|-----------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------|
| <b>MSP početnice</b>     |                 |                           |                            |                       |
| <i>SUFU metilirani</i>   | NC_000010.11    | GTTTCGGGGAGTTTATTATTATC   | GAAAAACCGAAAAAACAATCG      | 180                   |
| <i>SUFU nemetilirani</i> | NC_000010.11    | GTTTTCGGGGAGTTTATTATTATGA | AAACAAAAACCAAAAAACAATCA    | 183                   |
| <b>qRT-PCR početnice</b> |                 |                           |                            |                       |
| <i>WNT5a</i>             | NM_003392.7     | GCACCAGAGCAGACAACC        | TCACAACACGGGAGGAATCAG      | 89                    |
| <i>SUFU</i>              | NM_016169.4     | GCTGCTGACAGAGGACCCACA     | GTGCAGACACCAACGATCTGGA     | 84                    |
| <i>CTNNB1</i>            | NM_001904.4     | TGCGTACTGTCCCTCGGGCT      | ATGGCAGGCTCAGTGATGTCT      | 52                    |
| <i>GAPDH</i>             | NM_002046.7     | TGCACCACCAACTGCTTAGC      | GGCATGGACTGTGGTCATGAG      | 87                    |

pb – parovi baza; PCR - Polymerase Chain Reaction; MSP - Methylation specific polymerase chain reaction; qRT-PCR – Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction.



#### 4.2.6. Mikro RNA analiza

Za mikroRNA analizu prvo je bila potrebna izolacija ukupne RNA s pet uzastopnih rezova debljine 5  $\mu\text{m}$  FFPE-uzoraka posteljica, po 14 uzoraka iz kontrolne i 14 iz IUGR grupe, prema već ranije opisanom načinu. Potom je slijedilo pročišćivanje pomoću „NucleoSpin miRNA Plasma“ kita (Macherey-Nagel, Germany).

Reverzno prepisivanje je učinjeno pomoću kita „TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit“ (Applied Biosystems, USA) i specifičnih početnica s petljama (engl. *loop primers*) za Hsa-miR-214-3p (assay ID 002306, Applied Biosystems, USA) i Hsa-miR-378a-5p (assay ID 000567, Applied Biosystems, USA) prema uputama proizvođača. Razine miRNA ekspresije ciljnih miRNA određene su pomoću „TaqMan microRNA assay“ i „TaqMan™ Universal master Mix II, noUNG“ (Thermo Fisher Scientific, USA) prema uputama proizvođača.

Za endogenu kontrolu korištene su male nuklearne RNA U6 (engl. small nuclear RNA U6-U6 snRNA assay ID 001973, Applied Biosystem, USA). Korišteni su sljedeći termociklički uvjeti (CFX-96 real-time qPCR detection system; Bio-Rad Laboratories, Inc.): početna denaturacija pri 95 °C tijekom 10 min, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa pri 95 °C tijekom 15 s i 60 °C tijekom 60 s. Sve qPCR reakcije izvedene su u triplikatima i podaci su analizirani pomoću  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  metode kako je već ranije navedeno (269).

#### 4.2.7. Statistička analiza

Normalnost distribucije podataka testirana je korištenjem Shapiro-Wilkovog testa. Kontinuirane varijable su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) ili medijan s inerkvartilnim rasponom (Q1, Q3). Kategoričke varijable su prikazane kao frekvencije (n) i postoci (%). Na temelju normalnosti distribucije podataka, razlike između grupa za kvantitativne varijable analizirane su pomoću Studentovog t-testa (za podatke s normalnom distribucijom) ili Mann-Whitney U testa (za podatke s nenormalnom distribucijom).

Prema potrebi, kategoričke su varijable uspoređivane pomoću Chi-square ili Fisherovog exact testa. U cilju korekcije višestrukih usporedbi, nakon provedenog Chi-square ili

Fisherovog exact testa, upotrjebljena je Bonferronijeva korekcija s navođenjem korektivnih t-vrijednosti, gdje je bilo potrebno.

Za statističku analizu dobivenih podataka korišten je SPSS Statistički softver (verzije 27.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA; kod licence 782a173a1dd18687a8e5). Prag prihvatanja, odnosno odbacivanja hipoteze bio je na razini vjerojatnosti od  $P < 0,05$ .

## 5. REZULTATI

### 5.1. Klinički podaci

Analizirane su sljedeće kliničke varijable: dob majke, tjelesna masa i visina majke, indeks tjelesne mase (engl. *Body mass index*, BMI) majke prije trudnoće te u vrijeme porođaja, prirast tjelesne mase majke u trudnoći, masa i dužina novorođenčeta, masa posteljice te omjer mase novorođenčeta i posteljice (engl. *Fetal/placental weight ratio*).

Statistički značajno manja masa i dužina novorođenčeta te masa posteljice nađene su u novorođenčadi iz trudnoća sa IUGR-om ( $P < 0,001$ ). IUGR je bio učestaliji kod ženske novorođenčadi ( $P = 0,033$ ).

Nadalje, očekivano su trudnoće s IUGR-om statistički značajno učestalije dovršavane carskim rezom ( $P = 0,001$ ). Prosječna dob majke u grupi s IUGR-om je bila statistički značajno viša u usporedbi sa prosječnom dobi majki iz skupine sa urednim trudnoćama ( $P = 0,035$ ).

Medijan gestacijske dobi u vrijeme porođaja je bio statistički značajno niži u skupini trudnoća s IUGR-om u odnosu na kontrolnu skupinu, odnosno  $38+3/7$  ( $38+2/7$ ,  $39+4/7$ ) i  $39+3/7$  tjedana ( $39+3/7$ ,  $40+5/7$ ) ( $P = 0,001$ ), što je također očekivano (Tablica 2).

**Tablica 2.** Klinički parametri za majke i novorođenčad iz kontrolne i ispitivane (IUGR) skupine

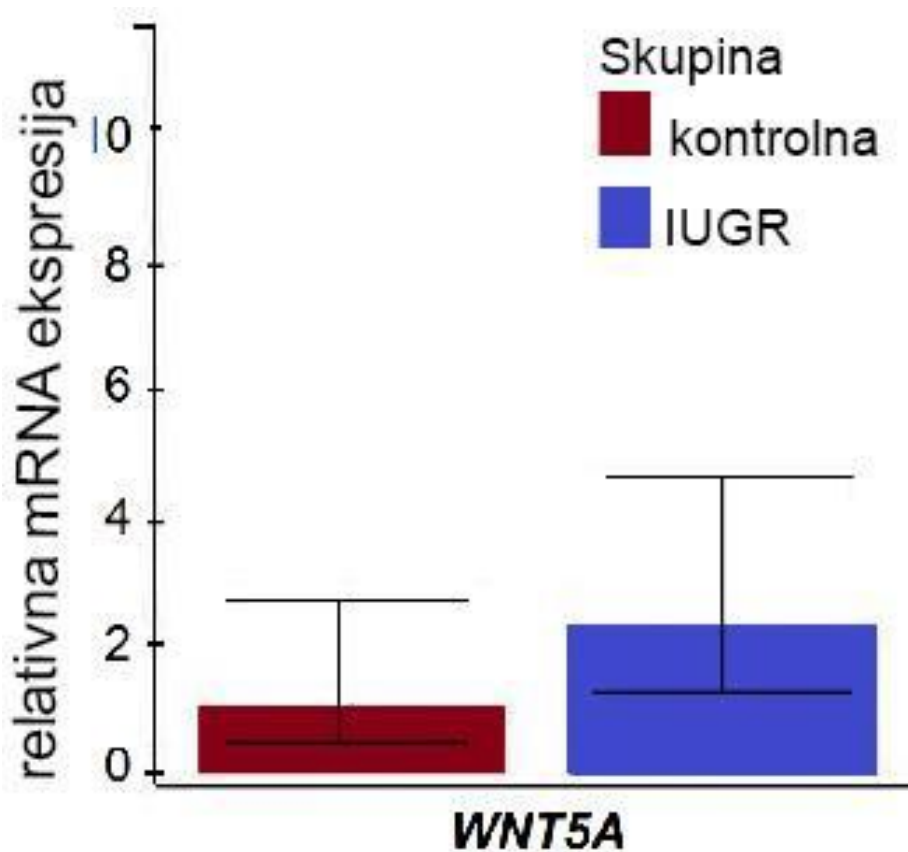
| Varijabla                                       | Kontrolna skupina<br>(n=18)  | IUGR<br>(n=34)               | P-<br>vrijednost    |
|-------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------|
| Dob majke (godine)                              | 28,5 ± 3,6                   | 31,6 ± 5,5                   | 0,035 <sup>a</sup>  |
| Gestacijska dob pri porođaju (tjedni + dani)    | 39 + 3/7<br>(39+2/7, 40+5/7) | 38 + 3/7<br>(38+2/7, 39+4/7) | 0,001 <sup>a</sup>  |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> ) prije trudnoće         | 21,9<br>(19,3, 22,9)         | 20,2<br>(19,0, 21,7)         | 0,532               |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> ) na porođaju            | 26,6 ± 2,7                   | 26,0 ± 3,0                   | 0,532               |
| Visina majke (cm)                               | 168,4 ± 5,5                  | 166,2 ± 7,0                  | 0,253               |
| Tjelesna masa majke na porođaju (kg)            | 75,4 ± 8,0                   | 72,0 ± 9,6                   | 0,210               |
| Prirast tjelesne mase majke tokom trudnoće (kg) | 16,0 (13,0, 18,5)            | 14,0 (11,0, 20,0)            | 0,159               |
| Porođajna masa novorođenčeta (g)                | 3516,7 ± 336,9               | 2435,9 ± 195,9               | <0,001 <sup>a</sup> |
| Porođajna dužina novorođenčeta (cm)             | 51,0 (50,0, 5,2)             | 46,0 (45,7, 48,0)            | <0,001 <sup>a</sup> |
| Masa posteljice (g)                             | 554,6 ± 76,6                 | 369,7 ± 80,2                 | <0,001 <sup>a</sup> |
| Omjer mase novorođenčeta i posteljice           | 6,4 ± 0,9                    | 6,9 ± 1,5                    | 0,253               |
| <b>Spol, n (%)</b>                              |                              |                              |                     |
| Muški                                           | 13 (72,2)                    | 14 (41,2)                    | 0,033 <sup>a</sup>  |
| Ženski                                          | 5 (27,8)                     | 20 (58,8)                    |                     |
| <b>Način porođaja, n (%)</b>                    |                              |                              |                     |
| Carski rez                                      | 0 (0,0)                      | 14 (41,2)                    | 0,001 <sup>a</sup>  |
| Vaginalni porođaj                               | 18 (100,0)                   | 20 (58,8)                    |                     |

<sup>a</sup>Statistički značajna razlika. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, medijan (Q1, Q3) ili n (%). BMI – indeks tjelesne mase, Body mass index)

## 5.2. WNT5A

### 5.2.1. mRNA ekspresija gena *WNT5A* u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini

RT-qPCR analizom je pokazano da je ciljani gen *WNT5A* transkripcijski aktivan i u posteljicama s IUGR-om, kao i u posteljicama u kontrolnoj skupini. Relativna razina mRNA ekspresije *WNT5A* je viša u posteljica s IUGR-om u odnosu na uredne posteljice, no navedena razlika nije statistički značajna (Slika 11).

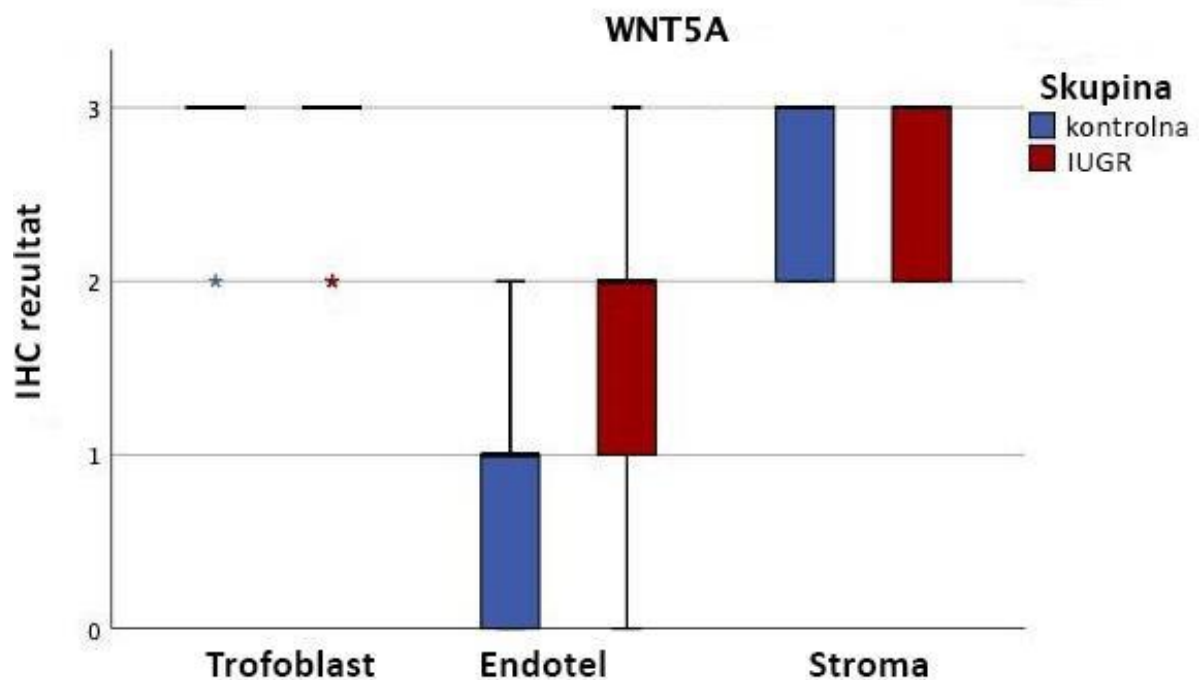


**Slika 11.** mRNA ekspresija gena *WNT5A* u posteljicama s IUGR-om te u kontrolnim posteljicama iz urednih trudnoća normalizirana prema GAPDH i relativna u odnosu na kontrolnu skupinu. IUGR, intrauterine growth restriction.

### 5.2.2. Proteinska ekspresija WNT5A u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini

Proteinska ekspresija WNT5A u posteljicama s IUGR-om je u > 10% endotelnih stanica prisutna u 70,5% uzoraka. U kontrolnoj skupini je pak ekspresija WNT5A prisutna u <10% endotelnih stanica u čak 94,4% uzoraka. Proteinska ekspresija WNT5A prisutna je u >10% stromalnih stanica u čak 100% uzoraka iz obje skupine. Proteinska ekspresija WNT5A prisutna je u > 10% trofoblasta u čak 100% uzoraka iz obje skupine (Tablica 3; Slika 12; Slika 13; Slika 14; Slika 15).

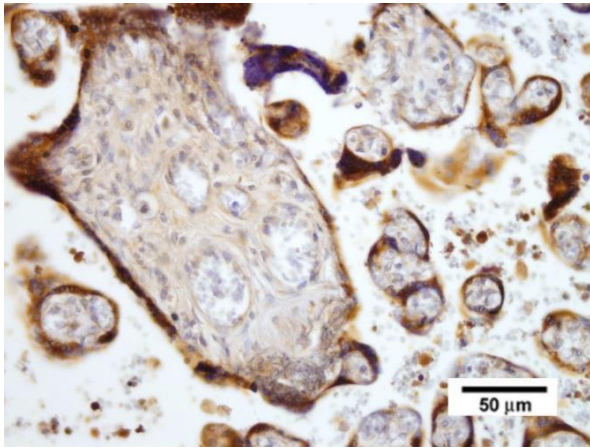
Proteinska ekspresija WNT5A je bila statistički značajno viša u endotelnim stanicama posteljičnih resica ( $P < 0,001$ ) u posteljicama s IUGR-om, u usporedbi sa kontrolnom skupinom (Slika 13).



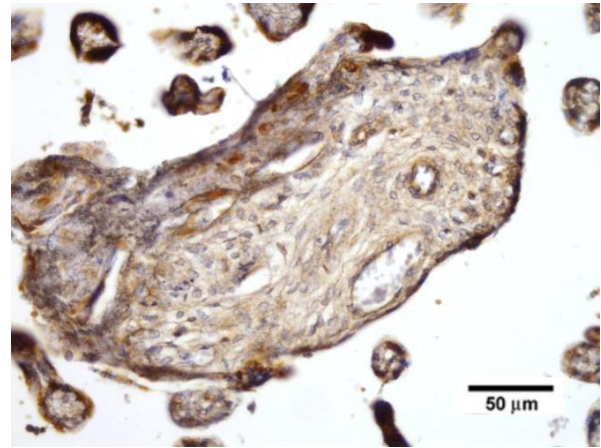
**Slika 12.** Grafički prikaz proteinske ekspresije WNT5A u IUGR i kontrolnoj skupini u trofoblastu, endotelu i stromi. 0, nije uočeno bojenje; 1, <10% stanica je obojano; 2, 10 - 50% stanica je obojano; i 3, >50% stanica je obojano. Zvezdice označavaju ekstremne izvanredne vrijednosti. IHC, imunohistochemistry; IUGR, intrauterine growth restriction.

**Tablica 3.** Proteinska ekspresija WNT5A u IUGR i kontrolnoj skupini posteljica.

| ekspresija WNT5A | Trofoblast                 |                        |              | Stromalne stanice          |                        |              | Endotelne stanice          |                        |              |
|------------------|----------------------------|------------------------|--------------|----------------------------|------------------------|--------------|----------------------------|------------------------|--------------|
|                  | normalne posteljice (n=18) | IUGR posteljice (n=34) | p-vrijednost | normalne posteljice (n=18) | IUGR posteljice (n=34) | p-vrijednost | normalne posteljice (n=18) | IUGR posteljice (n=34) | p-vrijednost |
| > 50%            | 16 (88,9%)                 | 29 (85,3%)             | 0,718        | 11 (61,1%)                 | 20 (58,8%)             | 0,873        | 0 (0,0%)                   | 6 (17,6%)              | 0,001        |
| 10-50%           | 2 (11,1%)                  | 5 (14,7%)              |              | 7 (38,9)                   | 14 (41,2%)             |              | 1 (5,6%)                   | 18 (52,9%)             |              |
| < 10%            | 0 (0,0%)                   | 0 (0,0%)               | 0 (0,0%)     | 0 (0,0%)                   | 0 (0,0%)               | 9 (50,0%)    | 3 (8,8%)                   |                        |              |
| 0%               | 0 (0,0%)                   | 0 (0,0%)               | 0 (0,0%)     | 0 (0,0%)                   | 0 (0,0%)               | 8 (44,4%)    | 7 (20,7%)                  |                        |              |

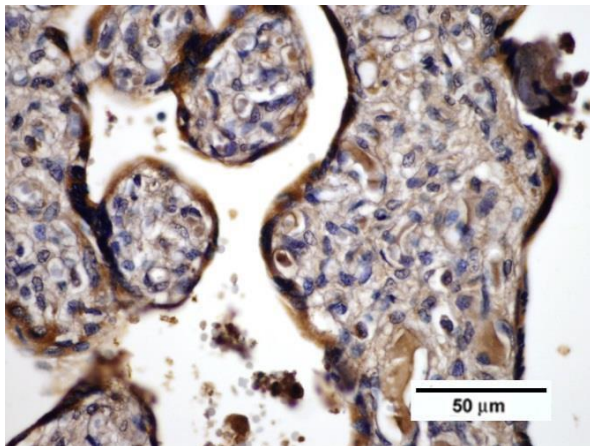


A

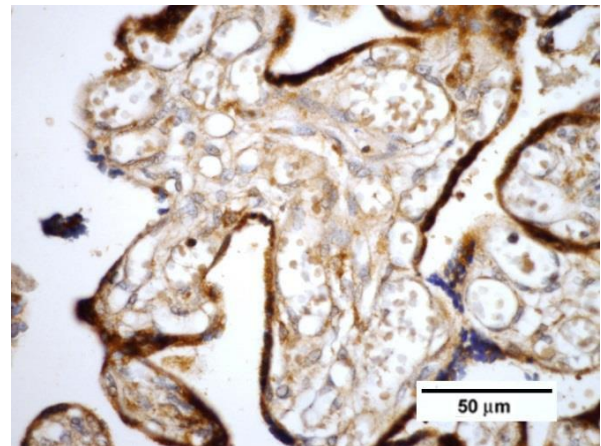


B

**Slika 13.** Analiza proteinske ekspresije WNT5A u posteljičnoj resici iz kontrolne (A) i IUGR (B) skupine pokazala je povećanu ekspresiju u endotelnim stanicama posteljice s IUGR-om. Traka mjerila, 50  $\mu\text{m}$ . Povećanje 400x. IUGR, intrauterine growth restriction.



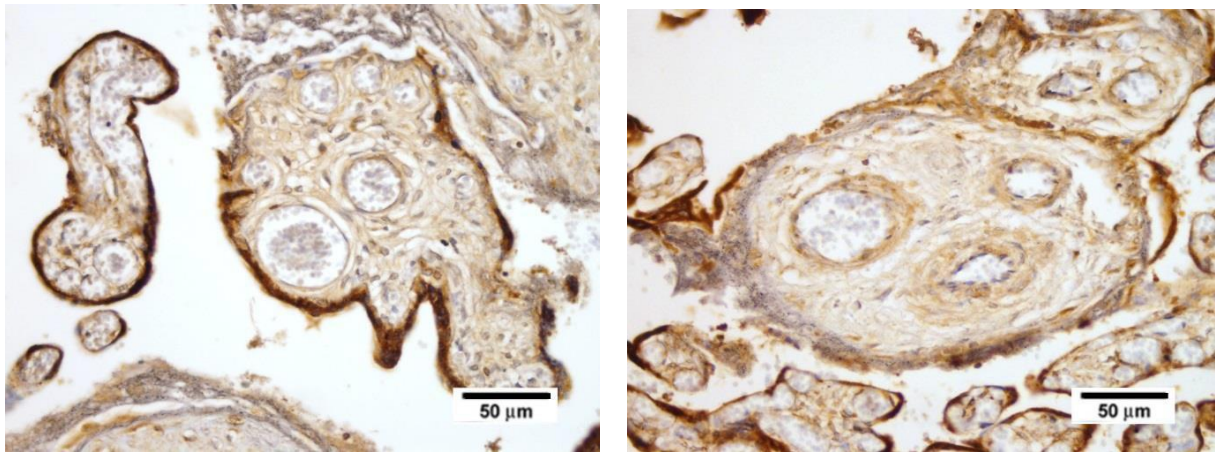
A



B

**Slika 14.** Analiza proteinske ekspresije WNT5A pokazala je da nema statistički značajne razlike u ekspresiji u trofoblastu posteljične resice u kontrolnoj (A) i IUGR (B) skupini. Traka mjerila, 50  $\mu\text{m}$ . Povećanje 600x. IUGR, intrauterine growth restriction.





A

B

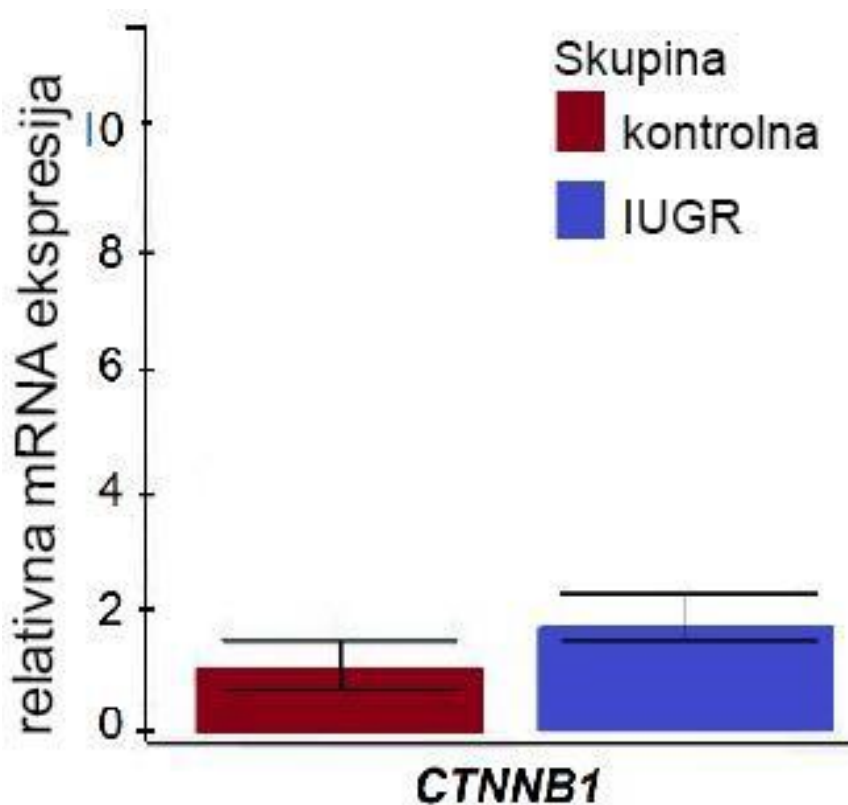
**Slika 15.** Analiza proteinske ekspresije WNT5A pokazala je da nema statistički značajne razlike u ekspresiji u stromi posteljične resice u kontrolnoj (A) i IUGR (B) skupini.

Traka mjerila, 50 µm. Povećanje 400x. IUGR, intrauterine growth restriction.

### 5.3. $\beta$ -KATENIN

#### 5.3.1. mRNA ekspresija gena *CTNNB1* u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini

RT-qPCR analizom je pokazano da je ciljani gen *CTNNB1* transkripcijski aktivan i u posteljicama s IUGR-om, kao i u kontrolnim posteljicama. Dapače, u IUGR kao i u kontrolnoj skupini *CTNNB1* gen je pokazao najvišu transkripcijsku aktivnost i najvišu razinu genske ekspresije, no niti u jednoj skupini ona nije bila statistički značajna (podaci nisu prikazani) (Slika 16).

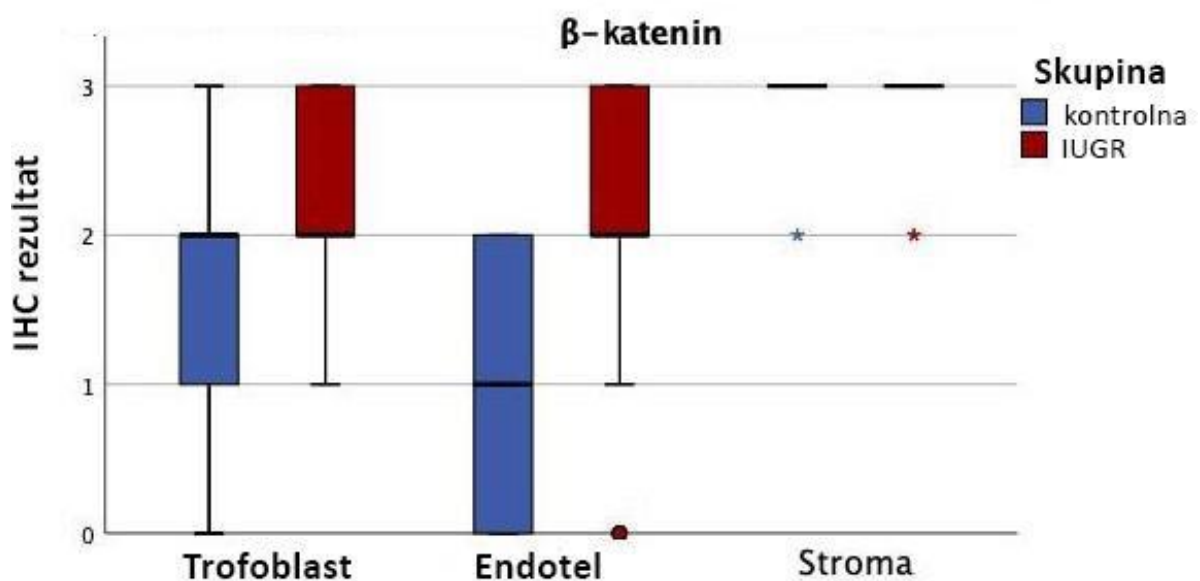


**Slika 16.** mRNA ekspresija *CTNNB1 $\beta$*  gena u posteljicama s IUGR-om te u kontrolnim posteljicama iz urednih trudnoća normalizirana prema GAPDH i relativna u odnosu na kontrolnu skupinu. *CTNNB*, *catenin  $\beta$ 1*; IUGR, intrauterine growth restriction.

### 5.3.2. Proteinska ekspresija $\beta$ -katenina u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini

U posteljicama sa IUGR-om je  $\beta$ -katenin ekspimiran  $>10\%$  u endotelnim stanicama u čak 79,4% uzoraka. U kontrolnoj skupini je pak ekspimiran u  $<10\%$  endotelnih stanica u 55,6% uzoraka. Osim toga, u posteljica s IUGR-om je ekspresija  $\beta$ -katenina prisutna u  $>10\%$  stanica trofoblata u čak 94,1% uzoraka, dok je u trofoblastu u kontrolnoj skupini prisutna  $>10\%$  u 66,7% uzoraka. Proteinska ekspresija  $\beta$ -katenina je prisutna u  $>10\%$  stromalnih stanica u čak 100% uzoraka iz obje skupine (Tablica 4; Slika 17; Slika 18; Slika 19).

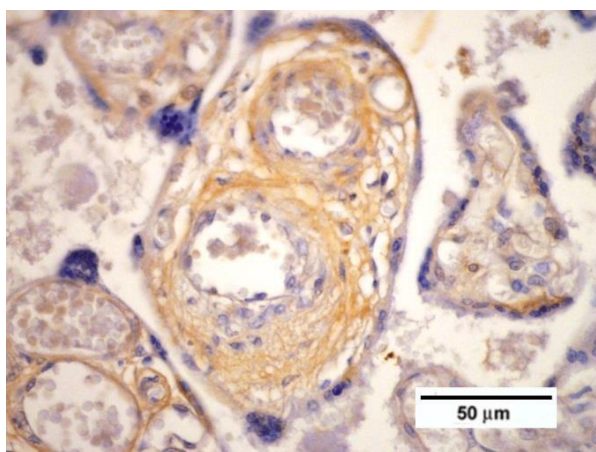
Proteinska ekspresija  $\beta$ -katenina je bila statistički značajno viša u trofoblastu ( $P=0,026$ ) te u endotelnim stanicama posteljičnih resica ( $P<0,001$ ) u posteljicama s IUGR-om, u usporedbi sa kontrolnom skupinom (Slika 18).



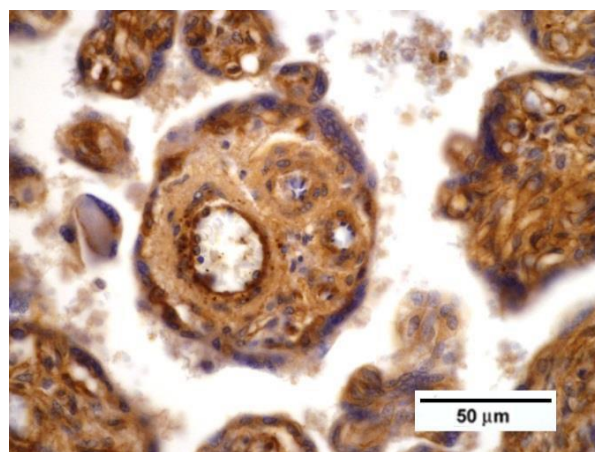
**Slika 17.** Grafički prikaz proteinske ekspresije  $\beta$ -katenina u IUGR i kontrolnoj skupini u trofoblastu, endotelu i stromi. 0, nije uočeno bojenje; 1,  $<10\%$  stanica je obojano; 2, 10 - 50% stanica je obojano; i 3,  $>50\%$  stanica je obojano. Zvezdice označavaju ekstremne izvanredne vrijednosti, dok kružići označavaju izvanredne vrijednosti. IHC, imunohistochemistry; IUGR, intrauterine growth restriction.

**Tablica 4.** Proteinska ekspresija  $\beta$ -katenina u IUGR i kontrolnoj skupini posteljica.

| ekspresija $\beta$ -katenina | Trofoblast                 |                        | Stromalne stanice          |                        | Endotelne stanice          |                        | p-vrijednost |
|------------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|--------------|
|                              | normalne posteljice (n=18) | IUGR posteljice (n=34) | normalne posteljice (n=18) | IUGR posteljice (n=34) | normalne posteljice (n=18) | IUGR posteljice (n=34) |              |
| > 50%                        | 3 (16,7%)                  | 11 (32,4%)             | 16 (88,8%)                 | 32 (94,1%)             | 0 (0,0%)                   | 16 (47,1%)             | 0,002        |
| 10-50%                       | 9 (50%)                    | 21 (61,7%)             | 2 (11,2%)                  | 2 (5,9%)               | 8 (44,4%)                  | 11 (32,3%)             |              |
| < 10%                        | 5 (27,8%)                  | 2 (5,9%)               | 0 (0,0%)                   | 0 (0,0%)               | 2 (11,2%)                  | 3 (8,8%)               | 0,602        |
| 0%                           | 1 (5,5%)                   | 0 (0,0%)               | 0 (0,0%)                   | 0 (0,0%)               | 8 (44,4%)                  | 4 (11,8%)              |              |
|                              |                            |                        |                            |                        |                            |                        | 0,059        |

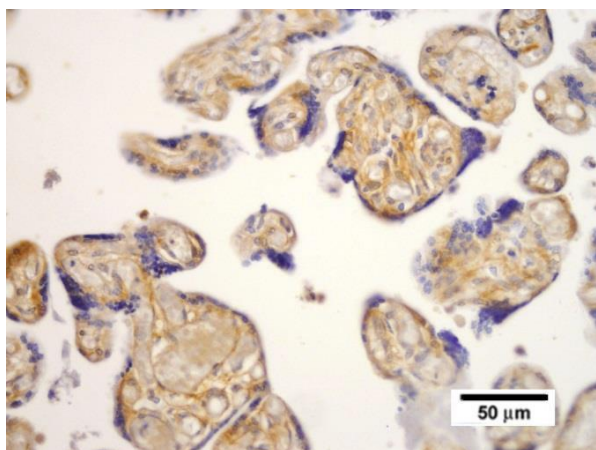


A

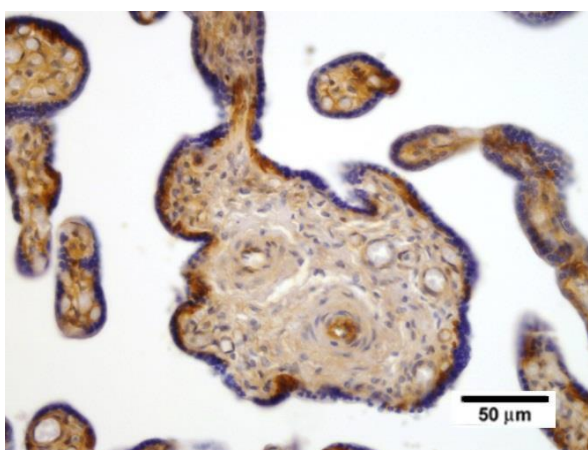


B

**Slika 18.** Analiza proteinske ekspresije  $\beta$ -katenina u posteljičnoj resici iz kontrolne (A) i IUGR (B) skupine pokazala je statistički značajno povećanu ekspresiju u trofoblastu i endotelnim stanicama posteljice s IUGR-om. Traka mjerila, 50  $\mu$ m. Povećanje 600x. IUGR, intrauterine growth restriction



A



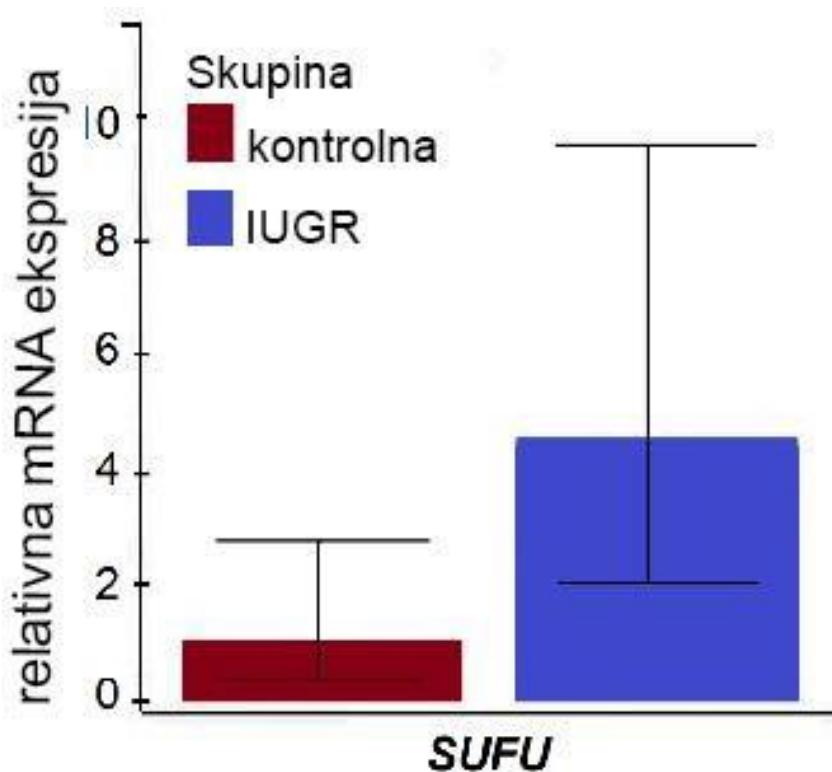
B

**Slika 19.** Analiza proteinske ekspresije  $\beta$ -katenina pokazala je da nema statistički značajne razlike u ekspresiji u stromi posteljične resice u kontrolnoj (A) i IUGR (B) skupini. Traka mjerila, 50  $\mu$ m. Povećanje 400x. IUGR, intrauterine growth restriction

## 5.4. SUFU

### 5.4.1. mRNA ekspresija gena *SUFU* u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini

RT-qPCR analizom je pokazano da je ciljani gen *SUFU* transkripcijski aktivan i u posteljicama s IUGR-om, kao i u kontrolnim posteljicama. Relativna razina mRNA ekspresije *SUFU* je viša u posteljica s IUGR-om, u odnosu na uredne posteljice, no navedena razlika nije statistički značajna (Slika 20). Genska ekspresija *SUFU* najniža je od sva tri promatrana gena u skupini kontrolnih posteljica, no također bez statističke značajnosti (podaci nisu prikazani).

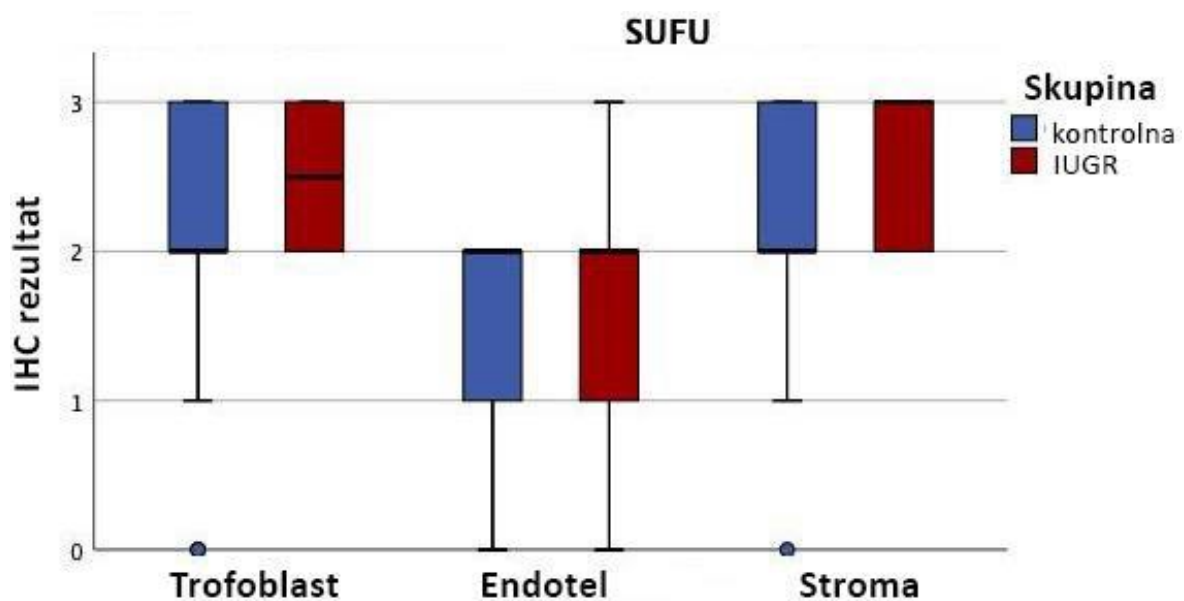


**Slika 20.** mRNA *SUFU* gena u posteljicama s IUGR-om te u kontrolnim posteljicama iz urednih trudnoća normalizirana prema GAPDH i relativna u odnosu na kontrolnu skupinu. IUGR, intrauterine growth restriction; *SUFU*, suppressor of fused.

#### 5.4.2. Proteinska ekspresija SUFU u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini

Proteinska ekspresija SUFU je nađena u >10% stanica trofoblata u čak 100% uzoraka posteljica sa IUGR-om i u 77,6% uzoraka posteljica iz kontrolne skupine. Proteinska ekspresija u >10% stromalnih stanica uočena je u 100% uzoraka posteljica s IUGR-om te u 83,3% uzoraka iz kontrolne skupine. Proteinska ekspresija SUFU je nađena u >10% edotelnih stanica u 58,8% uzoraka posteljica s IUGR-om i 55,5% uzoraka posteljica iz kontrolne skupine (Tablica 5; Slika 21; Slika 22; Slika 23).

Proteinska ekspresija SUFU je bila statistički značajno viša u trofoblastu posteljica s IUGR-om ( $P=0,029$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 22).

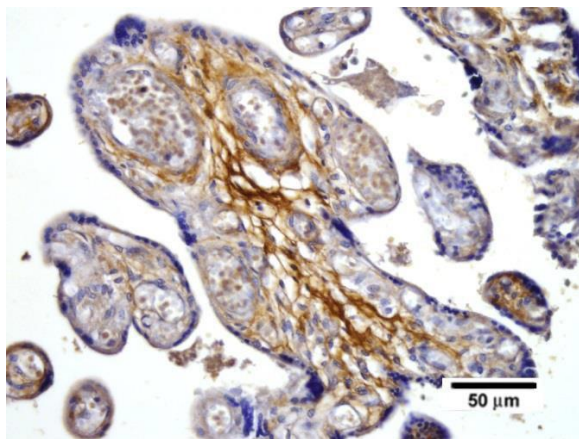


**Slika 21.** Grafički prikaz proteinske ekspresije SUFU u IUGR i kontrolnoj skupini u trofoblastu, endotelu i stromi. 0, nije uočeno bojenje; 1, <10% stanica je obojano; 2, 10 - 50% stanica je obojano; i 3, >50% stanica je obojano. Zvijezdica označava označavaju ekstremne izvanredne vrijednosti, dok kružići označavaju izvanredne vrijednosti. IHC, imunohistochemistry; IUGR, intrauterine growth restriction; SUFU, suppressor of fused.

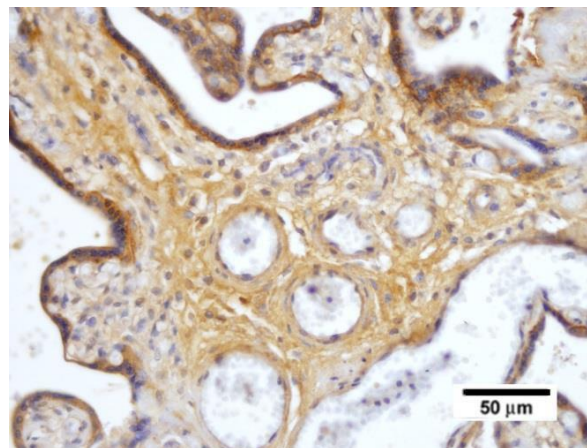
**Tablica 5.** Proteinska ekspresija SUFU u IUGR i kontrolnoj skupini posteljica.

| ekspresija SUFU | Trofoblast                 |                        | Stromalne stanice          |                        | Endotelne stanice          |                        | p-vrijednost |
|-----------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|--------------|
|                 | normalne posteljice (n=18) | IUGR posteljice (n=34) | normalne posteljice (n=18) | IUGR posteljice (n=34) | normalne posteljice (n=18) | IUGR posteljice (n=34) |              |
| > 50%           | 5 (27,8%)                  | 17 (50,0%)             | 8 (44,4%)                  | 20 (58,8%)             | 0 (0,0%)                   | 2 (5,9%)               | 0,44         |
| 10-50%          | 9 (50%)                    | 17 (50%)               | 7 (38,9%)                  | 14 (41,2%)             | 10 (55,5%)                 | 18 (52,9%)             |              |
| < 10%           | 2 (11,1%)                  | 0 (0,0%)               | 2 (11,2%)                  | 0 (0,0%)               | 5 (27,8%)                  | 12 (35,3%)             |              |
| 0%              | 2 (11,1%)                  | 0 (0,0%)               | 1 (5,5%)                   | 0 (0,0%)               | 3 (16,7%)                  | 2 (5,9%)               |              |
|                 | 0,03                       |                        | 0,105                      |                        |                            |                        |              |



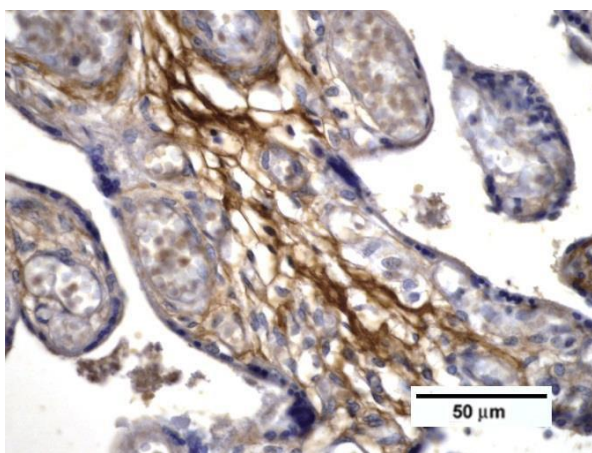


A

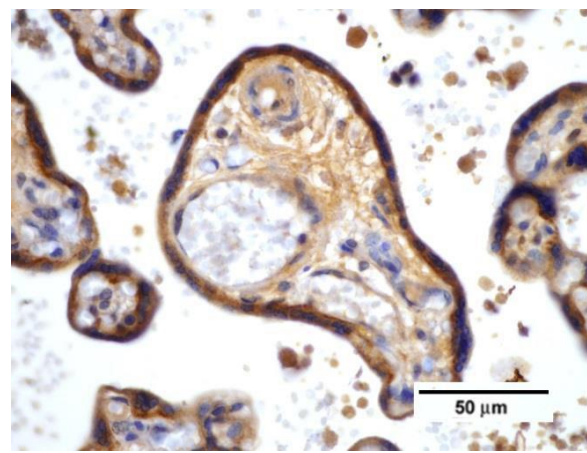


B

**Slika 22.** Analiza proteinske ekspresije SUFU u posteljnoj resici iz kontrolne (A) i IUGR (B) skupine pokazala je povećanu ekspresiju u trofoblastu posteljice s IUGR-om. Traka mjerila, 50 µm. Povećanje 400x. IUGR, intrauterine growth restriction; SUFU, suppressor of fused



A



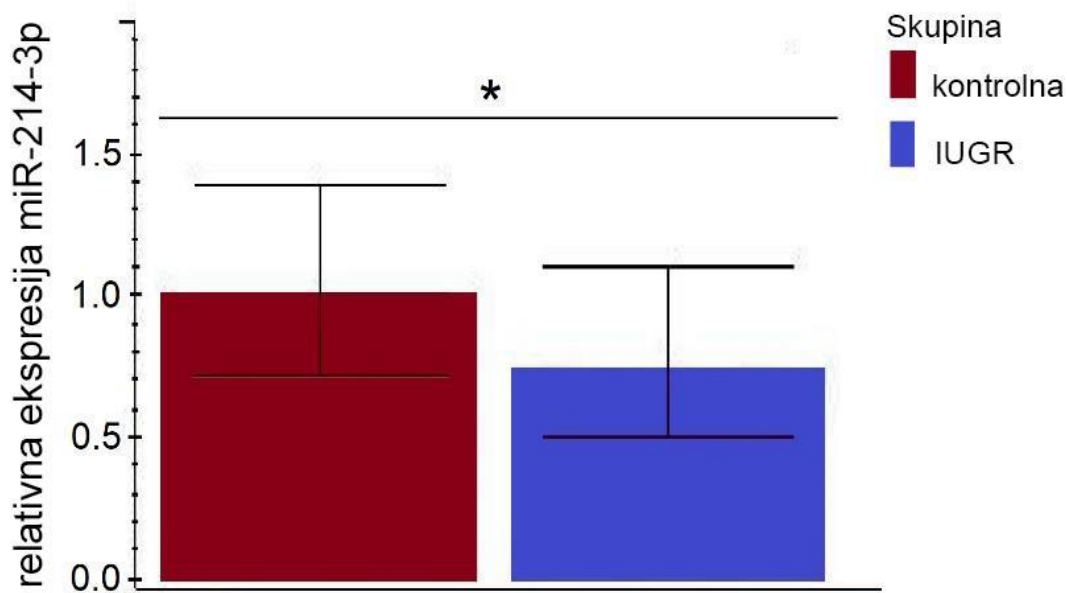
B

**Slika 23.** Analiza proteinske ekspresije SUFU pokazala je da nema statistički značajne razlike u ekspresiji u endotelu i stromi posteljne resice u kontrolnoj (A) i IUGR (B) skupini. Traka mjerila, 50 µm. Povećanje 600x. IUGR, intrauterine growth restriction.

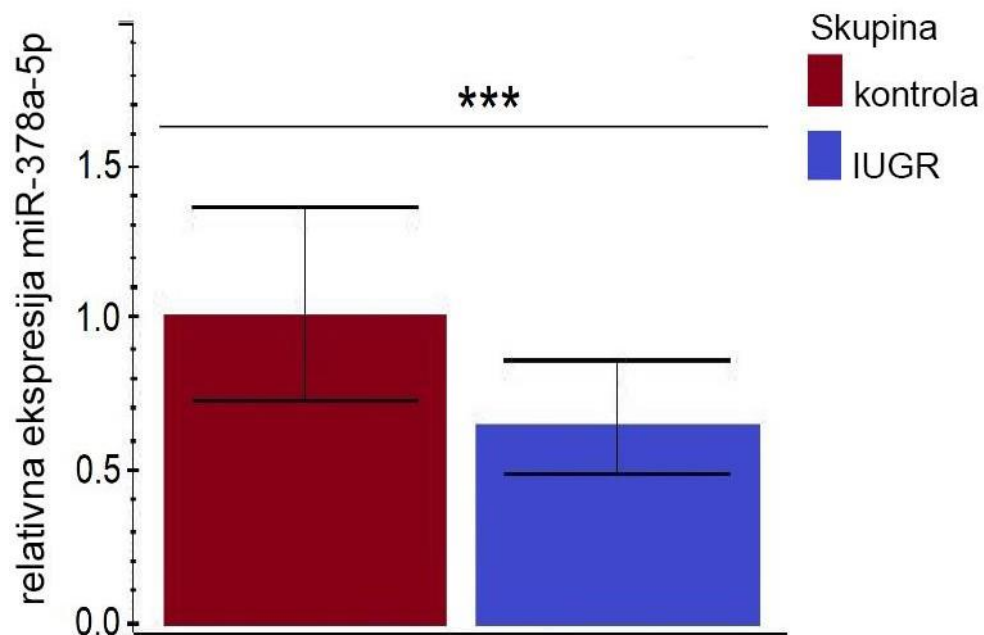
### 5.4.3. Epigenetska regulacija ekspresije gena *SUFU* u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini

#### 5.4.3.1. Ekspresija miR-314-3p i miR378a-5p u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini

Rt-qPCR analizom je dobiveno da su ciljane miR-214-3p i miR-378a-5p eksprimirane u svim uzorcima. Obje miR, miR-214-3p ( $P=0,040$ ) i miR-378a-5p ( $P<0,001$ ), imaju statistički nižu ekspresiju u posteljicama s IUGR-om u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 24; Slika 25). Osim toga, u kontrolnoj skupini miR-378a-5p ima višu transkripcijsku aktivnost, no ona nije bila statistički značajna (podaci nisu prikazani). U grupi posteljica s IUGR-om obje su ciljane miR imale slične razine ekspresije te su one bile niže u odnosu na njihovu ekspresiju u kontrolnoj skupini (podaci nisu prikazani).



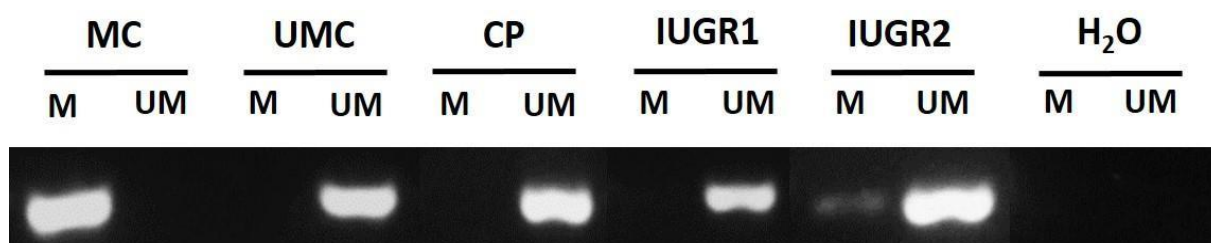
**Slika 24.** miR-214-3p ekspresija u IUGR te u kontrolnoj skupini posteljica normalizirano o U6 malih nuklearnih RNA i relativnih prema kontrolnoj skupini. \* $P<0.05$ . IUGR, *intrauterine growth restriction*; miR, mikroRNA.



**Slika 25.** Slika miR-378a-5p ekspresija u IUGR i u kontrolnoj skupini posteljica normalizirano o U6 malih nuklearnih RNA i relativnih prema kontrolnoj skupini.\*\*\*P<0,001. IUGR, intrauterine growth restriction; miR, mikroRNA.

#### 5.4.3.2. Metilacijski status promotora gena *SUFU* u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini

DNA promotor gena *SUFU* je analiziran pomoću PCR ovisnog o metilaciji (MSP) u 10 posteljica s IUGR-om te u 14 posteljica iz kontrolne skupine. Promotor gena *SUFU* je bio nemetiliran u svim posteljicama iz kontrolne skupine, a u skupini posteljica s IUGR-om samo je u jednoj posteljici pokazana slaba metilacija promotora gena *SUFU*, dok je u ostalima također bio nemetiliran (Slika 26).



**Slika 26.** Reprezentativni primjer MSP analize za promotor gena *SUFU* u terminskim posteljicama iz fizioloških trudnoća (CP) i terminskih posteljica iz trudnoća s IUGR-om. IUGR1 i IUGR2 su uzorci od različitih pacijentica. IUGR1 je reprezentativni primjer nemetiliranog gen promotora *SUFU* u posteljica s IUGR-om.

IUGR2 je uzorak posteljice s IUGR-om u kojoj je vidljivo prisustvo metiliranog promotora gena *SUFU*. CP, control placenta; H<sub>2</sub>O, voda, negativna kontrola; IUGR, intrauterine growth restriction; M, methylated reaction; MC, methylated human control, pozitivna kontrola za reakciju metilacije; UM, unmethylated reaction; UMC, unmethylated human control, pozitivna kontrola za nemetiliranu reakciju.

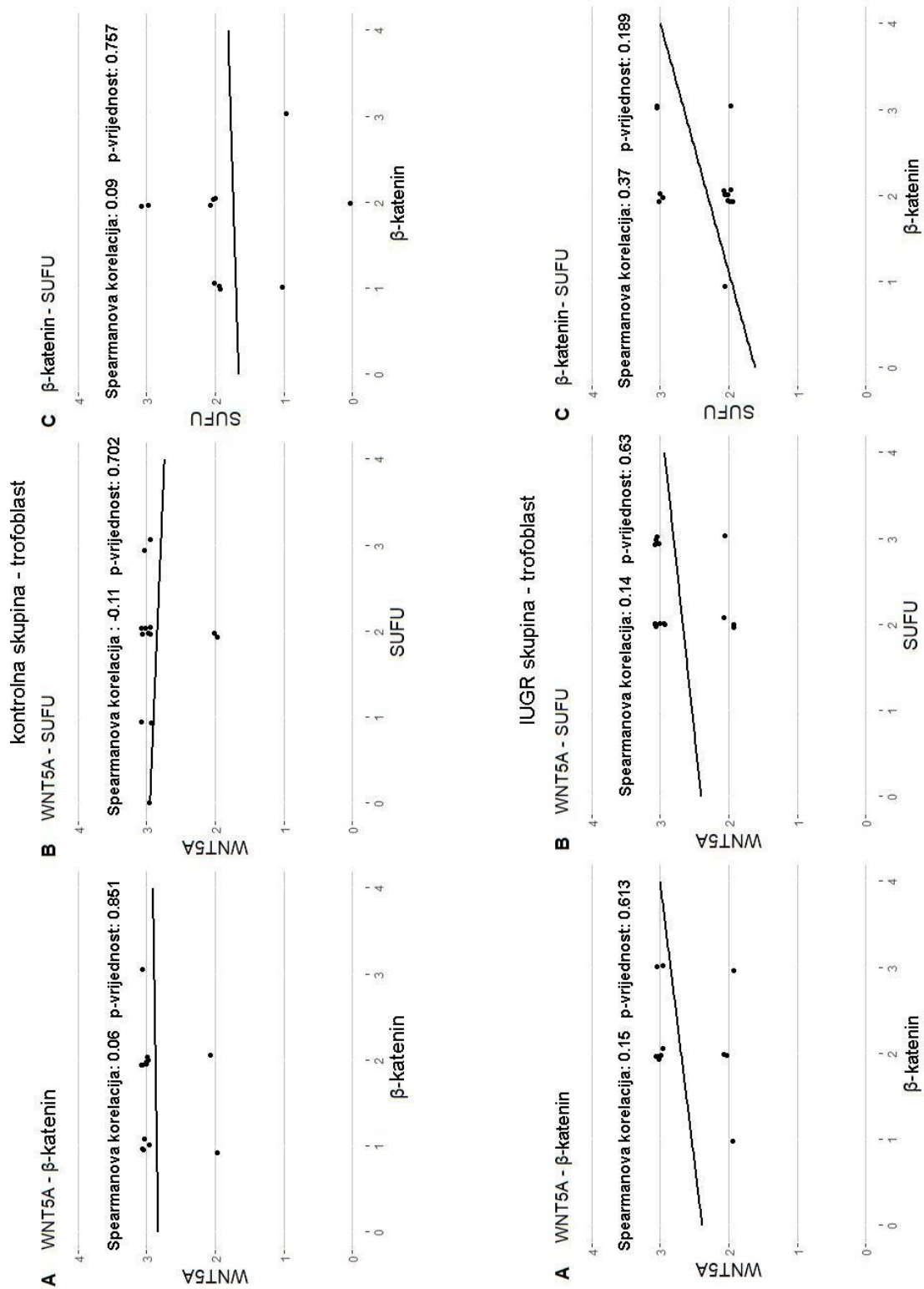
## **5.5. Korelacijska analiza proteina WNT5A, $\beta$ -katenina i SUFU u posteljicama u IUGR skupini i kontrolnoj skupini**

Međusobna korelacija ekspresije proteina WNT5A,  $\beta$ -katenina i SUFU analizirana je u trofoblastu, endotelu i stromi tkiva posteljica iz trudnoća s IUGR-om i iz urednih trudnoća. Korelacija je ispitana međusobnom usporedbom razina ekspresija proteina WNT5A,  $\beta$ -katenina i SUFU u navedenim tkivima određenima imunohistokemijskom analizom.

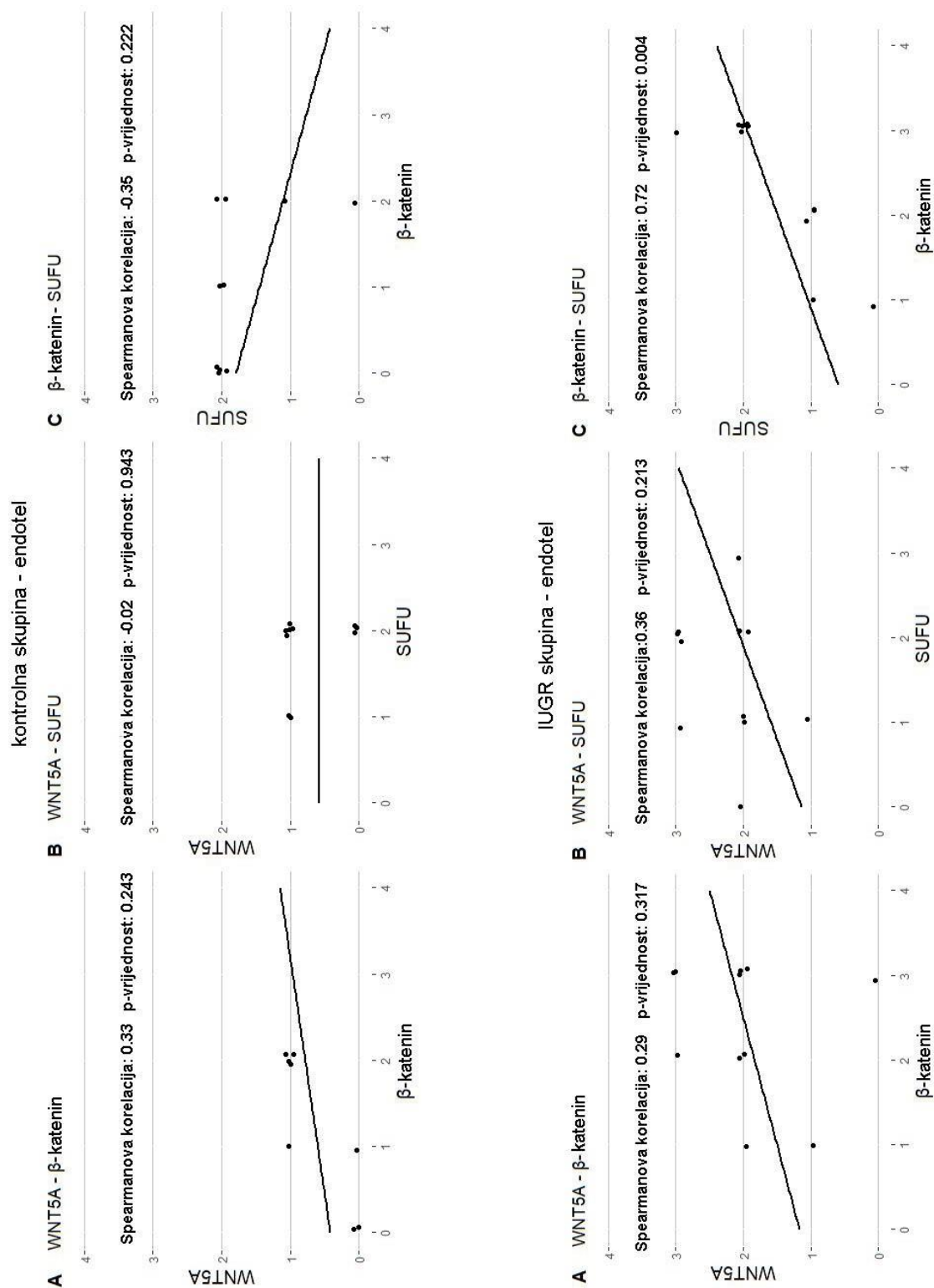
Korelacijskom analizom je pokazano da u trofoblastu posteljica s IUGR-om kao i u trofoblastu u kontrolnoj skupini proteinske ekspresije WNT5A,  $\beta$ -katenina i SUFU nisu međusobno u korelaciji, niti su statistički značajne (Slika 27).

Proteinska ekspresija niti jednoga od ispitivanih proteina nije u korelaciji u stromi posteljica s IUGR-om ili u kontrolnoj skupini niti je statistički značajna (Slika 28).

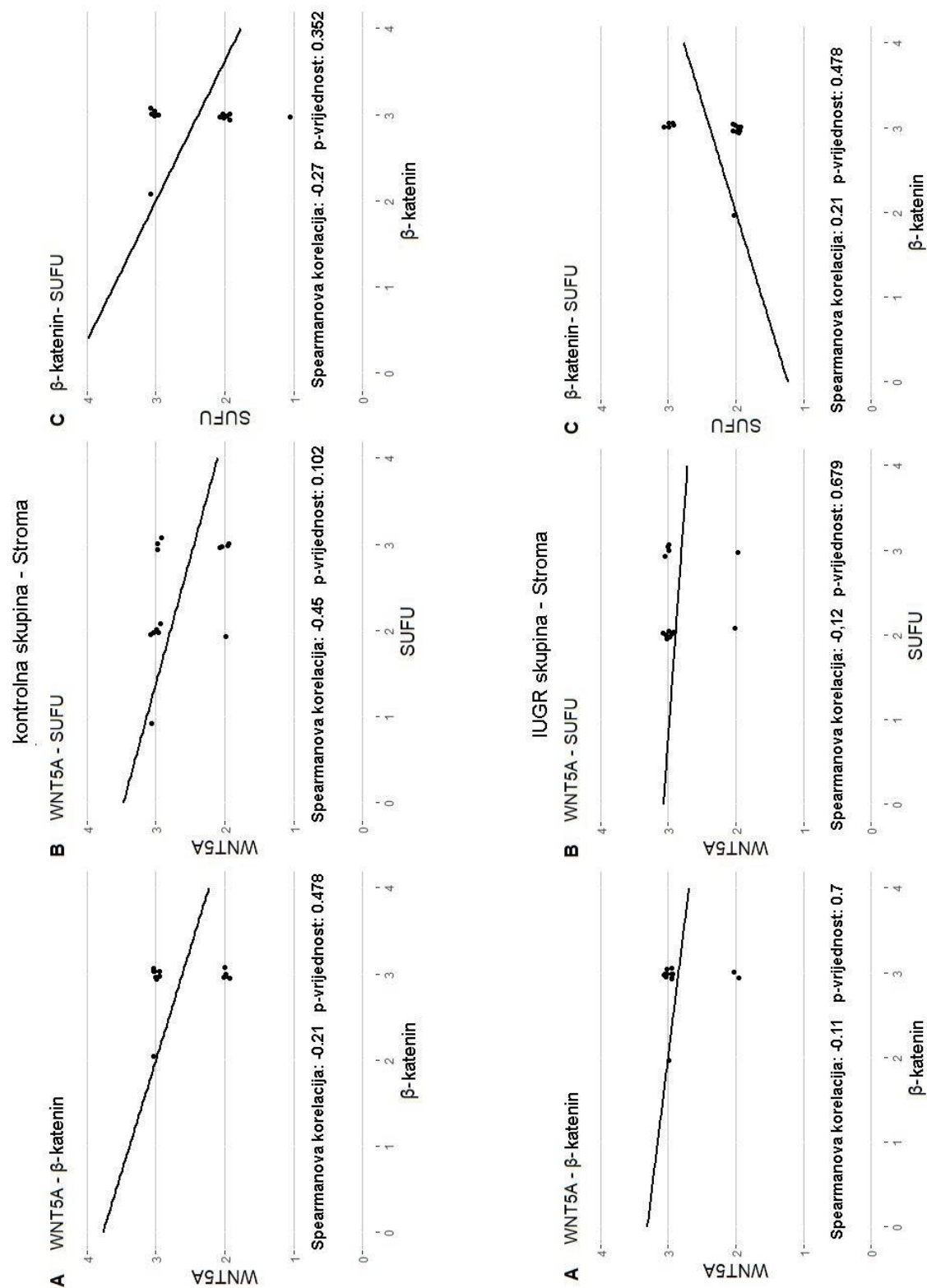
U endotelu posteljica iz kontrolne skupine proteinske ekspresije WNT5A i  $\beta$ -katenina te WNT5A i SUFU nisu u korelaciji niti su statistički značajne. Postoji negativna korelacija između  $\beta$ -katenina i SUFU, no ona također nije statistički značajna. U endotelu posteljica s IUGR-om također nema korelacije u proteinskoj ekspresiji WNT5A i  $\beta$ -katenina te WNT5A i SUFU te one nisu statistički značajne, no postoji značajna pozitivna korelacija u proteinskoj ekspresiji između  $\beta$ -katenina i SUFU (Spearmanova korelacija 0,72;  $P=0,004$ ) (Slika 29).



**Slika 27.** Grafički prikaz korelacijske ekspresije proteina WNT5A, β-katenina i SUFU u trofoblastu u kontrolnoj i IUGR skupini određene imunohistokemijskom analizom.



**Slika 28.** Grafički prikaz korelacije ekspresije proteina WNT5A,  $\beta$ -katenina i SUFU u kontrolnoj skupini i IUGR u endotelu određene imunohistokemijskom analizom pokazao je statistički značajnu pozitivnu korelaciju  $\beta$ -katenina i SUFU u endotelu u skupini s IUGR-om (Spearmanova korelacija 0,72; P=0,004).



**Slika 29.** Grafički prikaz korelacije ekspresije proteina WNT5A, β-kenatina i SUFU u stromi u kontrolnoj i IUGR skupini određene imunohistokemijskom analizom.



## 6. RASPRAVA

IUGR je kompleksan poremećaj u trudnoći koji označava nemogućnost ploda da ostvari svoj puni genetski potencijal za rast, a uzrokuje značajno povišenje perinatalnog i neonatalnog morbiditeta i mortaliteta. Dijagnoza se temelji na ultrazvučnoj procjeni mase ploda ispod 10. centile za gestacijsku dob prema utvrđenim krivuljama fetalnog rasta (6). S obzirom da oko 10% živorođene djece ima porođajnu masu ispod 10. centile te da je u te djece perinatalni mortalitet 6 - 10 puta veći, željeli smo istražiti moguće patološke mehanizme u pozadini ovog važnog poremećaja (5). S obzirom da je uteroplacentarna insuficijencija najčešći razlog kasnog IUGR-a u strukturno i kromosomski zdravih plodova, predmet našeg istraživanja je bila posteljica (7).

### 6.1. Klinički podaci

Naše je istraživanje pokazalo da je srednja dob majke statistički značajno viša u skupini s IUGR-om u usporedbi s kontrolnom skupinom. To je značajno stoga što postoje oprečni izvještaji o povezanost između dobi majke i rizika za nastanak IUGR-a. Naime, neka istraživanja su pokazala da je viša dob majke neovisan faktor rizika za IUGR, na što ukazuju i naši rezultati (270,271). Druga su istraživanja pokazala da nema povezanosti između dobi majke i rizika za nastanak IUGR-a (272–274). Istraživanje Yu i sur. je pak pokazalo da je mlađa dob majke rizični faktor za razvoj IUGR-a (275).

Nadalje, iz kliničkih podataka je vidljivo da je gestacijska dob pri porođaju statistički značajno niža u skupini djece rođene sa IUGR-om u odnosu na kontrolnu skupinu što je i očekivano. Naime, kako je već ranije istaknuto, s obzirom na rizike za plod u trudnoći opterećenoj IUGR-om, treba planirati porođaj tako da se pokuša dosegnuti zrelost djeteta. Cilj je izbjeći sve rizike za dijete uzrokovane prijevremenošću, a da se pritom ne uđe u rizik od povećanog fetalnog morbiditeta i mortaliteta koji u djece s IUGR-om raste s porastom gestacijske dobi (276,277).

Osim toga, naši podaci su pokazali statistički značajnu razliku u načinu porođaja, pa je tako više djece porođeno carskim rezom u odnosu na kontrolnu skupinu u kojoj niti jedno dijete nije rođeno carskim rezom. Ti su podaci također očekivani, jer je pokazano da je IUGR rizični faktor za dovršetak trudnoće, odnosno porođaja, carskim rezom. Naime, pokazano je da u porođaju djeteta s IUGR-om učestalije dolazi do razvoja intrauterine asfiksije koja dovodi do potrebe dovršetka porođaja hitnim carskim rezom, a učestalija je i odluka od dovršetku trudnoće carskim rezom nakon praćenja ploda kada se uslijed pogoršanja fetalne kondicije niti ne odlučuje puštati roditelju u vaginalni porođaj (278).

Osim porođajne mase i dužine novorođenčeta, u skupini djece s IUGR-om su očekivano i posteljice imale statistički značajno manju masu.

## **6.2. Proteinska ekspresija WNT5A i $\beta$ -katenina**

Posteljica je privremeni organ koji dijele majka i dijete i koji je neophodan za uspješnu trudnoću. Tijekom čitave trudnoće posteljica se neprestano prilagođava rastućim potrebama ploda što je presudno za održanje i napredovanje trudnoće. Za njezinu urednu funkciju su presudne implantacija i placentacija koje su složeni i precizno regulirani procesi između receptivnog endometrija i stanica trofoblasta koji uključuju niz različitih regulatora i staničnih puteva. Istraživanja su pokazala da je signalni put Wnt neophodan za urednu implantaciju i placentaciju koja uključuje specifičan obrazac balansiranja diferencijacije više tipova stanica trofoblasta te CTB-STB fuziju (3,4).

Stanice EVT-a imaju sposobnost migracije i invazije stijenki spiralnih endometralnih arterija čime posreduju u destrukciji arterijskog zida, što rezultira gubitkom njihova mišićnog sloja i stalnim proširenjem lumena krvnih žila koje više nisu podložne vazokonstrukciji pod utjecajem autonomnog živčanog sustava (279). Posljedično dolazi do pada otpora i kontinuiranog povećanog protoka krvi u sada uteroplacentarnim krvnim žilama, koje mogu osigurati sve potrebne hranjive tvari za uspješno napredovanje trudnoće. Neodgovarajuća invazija trofoblasta i izostanak ili nepotpuna pretvorba spiralnih arterija te neadekvatan razvoj krvožilne mreže u trofoblastnim resicama nađeni su patohistološkim pretragama u posteljicama iz trudnoća s IUGR-om (280,281).

Adekvatna invazija trofoblasta jedan je od ključnih trenutaka u ranoj trudnoći, jer je pokazano da će u slučaju izostanka invazije doći do pobačaja, dok se plitka invazija povezuje s nastankom IUGR-a i preeklampsije (8). S obzirom na važnu ulogu signalnog puta Wnt u razvoju i funkciji posteljice željeli smo ispitati razinu ekspresije proteina WNT5A i  $\beta$ -katenina, pozitivnih regulatora signalnog puta Wnt, u posteljica iz trudnoća s IUGR-om. Odabrali smo  $\beta$ -katenin, transkripcijski kofaktor koji je jedan od ključnih sudionika kanonskog puta Wnt za kojeg je pokazano da je odsudan za regulaciju EMT (10). Odabrali smo također i WNT5A, ekstracelularni ligand signalnog puta Wnt, kao jedan od rijetkih liganada koji može pokrenuti i kanonski i oba nekanonska puta Wnt. WNT5A potiče migraciju stanica, a bez njegove ekspresije nema implantacije, decidualizacije i razvoja posteljice (12,13). S obzirom na to da su WNT5A i  $\beta$ -katenin pozitivni regulatori signalnog puta Wnt, očekivali smo njihovu nižu proteinsku ekspresiju u posteljicama iz trudnoća s IUGR-om u odnosu na posteljice iz urednih trudnoća.

Ipak, rezultati našeg istraživanja pokazuju značajno višu proteinsku ekspresiju WNT5A u endotelnim stanicama te  $\beta$ -katenina u trofoblastu i endotelnim stanicama u posteljicama iz trudnoća s IUGR-om u odnosu na posteljice iz urednih trudnoća. Ovi rezultati su u korelaciji s rezultatima iz našeg ranijeg istraživanja u kojem je pokazana statistički značajno viša ekspresija sva tri Dishevelled proteina (DVL 1-3) u posteljicama s IUGR-om u odnosu na posteljice iz urednih trudnoća. Ti rezultati bi mogli ukazivati na to da u slučaju uteroplacentarne hipoksije dolazi do aktivacije signalnog puta Wnt koji potiče stvaranje novih krvnih žila u svrhu poboljšanja oksigenacije. Naime, on potiče sintezu VEGF-a koji je jedan od ključnih regulatora angiogeneze, a kojega aktivira upravo hipoksija (42,282).

Uteroplacentarna insuficijencija kao vodeći uzrok kasnog IUGR-a uzrokuje smanjen protok krvi u posteljici i posljedično kroničnu nutritivnu i respiratornu insuficijenciju ploda. Ishemija i potom reperfuzija krvi kroz spiralne arterije koje nisu prošle adekvatnu pretvorbu, dovode do oksidativnog stresa tijekom kojeg se oslobađaju reaktivni metaboliti kisika (engl. *Reactive oxygen species*, ROS) (281). Na jasnu poveznicu između oksidativnog stresa i IUGR-a te o doprinosu oksidativnog stresa metaboličkim posljedicama IUGR-a ukazalo je više istraživanja (283–286). Primjerice Zhang sa suradnicima ukazuje da oksidativni stres dovodi do pojačane ekspresije (engl. *Upregulation*) Wnt signalizacije čime se inducira angiogena aktivnost pridonoseći tako neovaskularizaciji (42). Funato i sur. su također izvijestili da ROS potiču

stabilizaciju  $\beta$ -katenina i aktivaciju signalnog puta Wnt (287). Osim toga, istraživanje Vikrama i sur. je ukazalo da supresija oksidativnog stresa antioksidansima prevenira defosforilaciju, odnosno aktivaciju  $\beta$ -katenina u endotelnim stanicama. Istovremeno, saopćili su da povećana ekspresija  $\beta$ -katenina povećava ROS u endotelnim stanicama krvnih žila te smanjuje bioraspoloživost vaskularnog dušičnog oksida (engl. *Endothelium-derived nitrogen oxide*, NO) čime onemogućava vazorelaksaciju ovisnu o endotelu (288). Nadalje, pokazano je da bi aktivni WNT3A i  $\beta$ -katenin mogli pojačavati ekspresiju (engl. *Upregulation*) TNF $\alpha$  (engl. *Tumor necrosis factor  $\alpha$* ) u endotelnim stanicama, što dovodi do daljnje disfunkcije endotelnih stanica (43). Osim toga, nađeno je da je u pacijenata koji boluju od dijabetesa tipa II ekspresija WNT5A u endotelnim stanicama bila čak 1,3 puta viša nego kod zdravih ljudi, a inhibicijom WNT5A došlo je do obnavljanja aktivnosti endotelne NO sintetaze koja dovodi do pojačane proizvodnje NO te prestanka endotelne disfunkcije (289).

Kako je već ranije istaknuto, signalni put Wnt dovodi do aktivacije VEGF-a, koji je jedan od ključnih faktora rasta koji dovodi do započinjanja angiogeneze (42). Važno je naglasiti da VEGF potiče lučenje NO. To je bitno i stoga što, osim što je važan vazodilatator, NO djeluje i kao medijator angiogeneze. Naime, NO stimulira proliferaciju i inhibira apoptozu endotelnih stanica te može suprimirati proizvodnju angiostatina koji je endogeni inhibitor angiogeneze. Tako u slučaju smanjenje aktivnosti NO dolazi do slabljenja angiogeneze (290).

Ovi podaci sugeriraju da hipoksija i oksidativni stres dovode do disfunkcije posteljice. Time bi se djelomično mogla pojasniti pojačana proteinska ekspresija  $\beta$ -katenina u endotelnim stanicama i stanicama trofoblasta te pojačana proteinska ekspresija WNT5A u endotelnim stanicama u posteljicama s IUGR-om u našem istraživanju.

Više je istraživanja do sada naglasilo i važnost signalnog puta Wnt u reguliranju apoptoze ističući njegovu antiapoptotičku aktivnost te važnu ulogu WNT5A u tom procesu (291,292). Tako bi se pojačana aktivnost Wnt signalizacije uočena u posteljicama iz trudnoća s IUGR-om u našem istraživanju mogla tumačiti i kao mogući zaštitni mehanizam koji svojom aktivacijom potiče angiogenezu i podržavanjem vazorelaksacije utječe na poboljšanje uteroplacentarnog protoka krvi i fetalne oksigenacije te smanjujući apoptozu stanica nastoji umanjiti negativne posljedice oksidativnog stresa.

S druge strane, rezultati istraživanja Wu i sur. upućuju na nižu proteinsku ekspresiju  $\beta$ -katenina u stanicama trofoblasta pogođenih hipoksijom te je nađena inhibicija proliferacije stanica trofoblasta, njihova oslabljena migracija i invazija te pretjerana apoptoza (293).

### 6.3. Proteinska ekspresija SUFU

Signalni put Hh ima presudnu ulogu u procesu implantacije i placentacije. Naime, istraživanje Pana i sur. je pokazalo da disfunkcija Hh signalizacije dovodi do inhibicije migracije i invazije trofoblasta te inhibicije angiogeneze u posteljici (237). Utvrđeno je i da signalni put Hh može izravno poticati stvaranje endotelnih stanica krvnih žila kao i sintezu vaskularnih faktora rasta čime regulira nastanak novih te razvoj već postojećih krvnih žila (15,16). Nadalje, Hh signalizacija potiče diferencijaciju CTB-a i CTB-STB fuziju i proces EMT u stanicama humanog trofoblasta koji su neophodni za urednu placentaciju (17,18). Zhang i Zhang su pronašli da poticanje ekspresije SHH i GLI1 preko transkripcijskog faktora FOXC2 (engl. *Forkhead Box protein C2*) pojačava aktivnost signalnog puta Hh, čime dolazi do povećavanja invazivnosti stanica trofoblasta (173). Svi ovi podaci ističu važnost ovog signalnog puta u fiziologiji humanog trofoblasta.

SUFU je ključni negativni regulator signalnog puta Hh čija se negativna regulacija odvija i u citoplazmi i u jezgri tako što modulira lokalizaciju i stabilnost transkripcijskih regulatora GLI (19,20). Istraživanja pokazuju da bi uloga negativnog regulatora signalnog puta Hh mogla biti tek jedna od uloga SUFU. Naime, Min i sur. navode da bi SUFU mogao biti negativni regulator i signalnog puta Wnt. S obzirom na to da su oba signalna puta ključna za diferencijaciju i proliferaciju trofoblasta te za urednu placentaciju, kako je ranije već istaknuto, SUFU bi mogao djelovati kao koordinator i svojevrsna poveznica u njihovoj međusobnoj interakciji (21). Nadalje, pokazano je da se SUFU može nalaziti i u istom kompleksu s  $\beta$ -kateninom, te da tada djeluje kao negativni regulator signalnog puta Wnt (216). Ipak, radova na tu temu još je malo te su kontradiktorni, pa tako Svard i sur. na mišjem modelu nisu našli dokaze o sudjelovanju SUFU u signalnom putu Wnt (213).

Upravo zbog presudne uloge signalnog puta Hh u posteljici i važnosti SUFU-a kao njegovog glavnog negativnog regulatora te mogućnosti da je regulator i signalnog puta Wnt, željeli smo

istražiti proteinsku ekspresiju SUFU u posteljicama iz trudnoća sa IUGR-om. Prema našim saznanjima uloga SUFU u placentaciji i IUGR-u još nije proučavana niti u jednoj dosadašnjoj studiji.

Naši rezultati pokazuju da je proteinska ekspresija SUFU značajno povišena u stanicama trofoblasta u posteljica s IUGR-om, dok nema značajnog povećanja ekspresije u stanicama endotela i strome. S obzirom da je SUFU negativni regulator signalnog puta Hh te moguće i puta Wnt, njegova bi povećana proteinska ekspresija u posteljicama iz trudnoća s IUGR-om mogla biti očekivana i može se objasniti smanjenom Hh signalizacijom u trofoblastu u trudnoći s IUGR-om te poremećenoj aktivnosti i funkciji trofoblasta koja i dovodi do neadekvatnog razvoja posteljice i posljedično nastanka IUGR-a. Rezultati našeg istraživanja su u skladu s tim saznanjima.

Međutim, povišena proteinska ekspresija pozitivnih regulatora signalnog puta Wnt, WNT5A i  $\beta$ -katenina, je također nađena u posteljicama iz trudnoća s IUGR-om u odnosu na posteljice iz urednih trudnoća, kako je ranije već obrazloženo. U tom kontekstu bi povišena proteinska ekspresija SUFU mogla ukazivati i na njegovu drugu moguću ulogu, osim one negativnog regulatora. Naime, istraživanje Liu i sur. je pokazalo da bi SUFU mogao biti i pozitivni regulator signalnog puta Hh koji bi mogao pojačavati Hh signalizaciju (294). Nadalje, pokazano je da RIOK3 (engl. *RIO kinase 3*) djeluje kao o SUFU ovisan pozitivan regulator Hh signalizacije sugerirajući time da bi SUFU mogao preko različitih spojeva vršiti dvostruku funkciju - pozitivnog i negativnog regulatora (295).

U našem je istraživanju korelacijskom analizom proteinske ekspresije  $\beta$ -katenina i SUFU u endotelu posteljica s IUGR-om nađeno da su u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji. Prema tome, iako proteinska ekspresija SUFU nije bila statistički značajna u endotelu posteljica s IUGR-om, on je ipak u tom tkivu djelovao kao pozitivni regulator  $\beta$ -katenina pa je time mogao značajno pozitivno utjecati na njegovu statistički značajno povećanu proteinsku ekspresiju u endotelu posteljica s IUGR-om. Ovi rezultati ukazuju na to da bi SUFU mogao djelovati kao pozitivni regulator signalnog puta Wnt.

Korelacijskom analizom proteinske ekspresije WNT5A,  $\beta$ -katenina i SUFU u trofoblastu posteljica s IUGR-om nije nađena statistički značajna korelacija u trofoblastu ili u stromi, a isto vrijedi i za korelacijsku analizu sva tri proteina u kontrolnoj skupini.

S obzirom na naše rezultate i sve navedeno, u sljedećim bi istraživanjima i na velikim uzorcima bilo zanimljivo istražiti ulogu i funkciju *SUFU* koja bi mogla biti specifična za pojedine puteve, regulatore i tkiva.

Rt-qPCR metodom smo pokušali utvrditi *WNT5A*, *CTNNB1* kojim je kodiran  $\beta$ -katenin, te *SUFU* mRNA ekspresiju u posteljicama iz trudnoća s IUGR-om i kontrolnih, urednih trudnoća te ih usporediti s njihovom proteinskom ekspresijom. U suprotnosti s njihovom proteinskom ekspresijom, RT-qPCR analizom u našem istraživanju nije nađeno značajne razlike u *WNT5A*, *SUFU* i *CTNNB1* mRNA ekspresiji između posteljica iz trudnoća s IUGR-om i kontrolnih, urednih trudnoća. To bi moglo biti objašnjeno činjenicom da je IHC metodom omogućena analiza proteinske ekspresije i kvantifikacije u različitim dijelovima posteljice, naime pojedinačno je analizirana u trofoblastu, stromalnim i endotelnim stanicama, dok je Rt-qPCR analiza provedena u ukupnom tkivu posteljice, a ne u njezinim pojedinačnim dijelovima kao IHC.

#### **6.4. Metilacijski status promotora gena *SUFU***

Pokazano je da posteljica pod utjecajem vanjskih faktora može mijenjati svoje funkcije pomoću različitih epigenetskih mehanizama. Tako fetalni rast osim što ovisi o genskim, ovisi također i o mnogim vanjskim faktorima koji putem epigenetskih mehanizama, te ovisno o njihovu međudjelovanju, mogu modulirati fetalni rast (2).

S obzirom na ranije istaknutu važnost signalnog puta Hh u posteljici i ulogu *SUFU* u njegovoj signalizaciji te činjenicu da prema našim saznanjima uloga *SUFU* do sada nije istraživana u posteljici i napose u posteljici iz trudnoće opterećene IUGR-om, u istraživanju smo osim genske i proteinske ekspresije *SUFU* htjeli odrediti i metilacijski status promotora gena *SUFU*.

Naime, pokazano je da je da je DNA metilacija jedan od ključnih epigenetskih mehanizma u posteljici te je na modelima posteljice u štakora pokazano da u slučaju blokiranja metilacije dolazi do poremećaja razvoja posteljice (252). DNA metilacija osim toga može dovesti i do promjena u ekspresiji gena važnih za metaboličku i endokrinu ulogu posteljice, što također može utjecati na rast ploda (253,254). S obzirom da je pokazano da DNA metilacija ima ključnu

ulogu u razvoju posteljice te da promjene u obrascima metilacije mogu dovesti do poremećaja morfologije posteljice i nepovoljnog ishoda trudnoće, očekivano je nađeno da je IUGR značajno povezan s promijenjenim obrascima DNA metilacije u posteljici (2,257). Osim toga, o samoj važnosti DNA metilacije govori i činjenica da je najproučavaniji način epigenetske regulacije (240).

Naši rezultati su pokazali da je promotor gena *SUFU* nemetiliran u svim uzorcima IUGR posteljica izuzev jednoga te da je također nemetiliran i u svim uzorcima posteljica iz urednih trudnoća. Stoga smo na temelju dobivenih rezultata zaključili da bi drugi epigenetski mehanizmi, a ne metilacija, mogli biti odgovorni za reguliranje genske ekspresije *SUFU*.

Unatoč dokazano važnoj ulozi DNA metilacije u regulaciji ekspresije gena u posteljici, druga istraživanja, uključujući naše, navode na zaključak da bi drugi epigenetski mehanizmi mogli biti uključeni u regulaciju ekspresije gena u posteljici. Istraživanje Kimure i sur. je pokazalo je da bi taj mehanizam mogao biti upravo post-translacijska modifikacija histona (262). Nadalje, Chuang i sur. su utvrdili da je histonska modifikacija povezana s ekspresijom gena odlučujućih za posredovanje kod fuzije trofoblasta te time ispravne strukture i funkcije posteljice (264).

## **6.5. Regulacija ekspresije gena *SUFU* putem miR-214-3p i miR-378a-5p**

Istraživanja su pokazala da bi različite miRNA, kao još jedan od epigenetskih mehanizama, mogle također biti aktivno uključene u regulaciju posteljičnih gena i razvoj posteljice (296). Naime, nađena je smanjena ekspresija više za posteljicu specifičnih miRNA u posteljicama iz trudnoća s IUGR-om u odnosu na posteljice iz urednih trudnoća (297). Istraživanje Pinelesa i sur. je pokazalo da postoje specifični obrasci miRNA ekspresije u posteljicama s preeklampsijom, a isto je potvrđeno i istraživanjem Zhu i sur. (260,261). Osim toga, promijenjene razine kisika mogle bi imati utjecaja na genetske i epigenetske kontrolne mehanizme uključene u razvoj posteljice (242). Naime, pokazano je da se u slučaju promjene razine kisika mijenja i ekspresija pojedinih miRNA u trofoblastu humane posteljice. Tako u slučaju hipoksije dolazi do pojačane ekspresije pojedinih miRNA, (engl. *Upregulation*), smanjene ekspresije drugih miRNA (engl. *Downregulation*), dok je za pojedine miRNA



utvrđeno da razina kisika nema nikakvog utjecaja na njihovu regulaciju (298). To saznanje bi moglo biti naročito važno kod IUGR-a s obzirom da je IUGR povezan sa kroničnom hipoksijom.

Peng i sur. su utvrdili da miRNA-20b ciljajući gen *SUFU* (engl. *Gene targeting*) kao negativni regulator signalnog puta Hh, ali i signalnog puta Wnt, potiče proliferaciju i migraciju malignih stanica (299).

Nadalje, još je istraživanja pokazalo da putem miRNA dolazi do smanjene genske ekspresije *SUFU* te se tako utišava *SUFU* u različitim vrsta tumora, primjerice u tkivima tumora dojke, želuca, karcinoma bazalnih stanica te ne-malostaničnog karcinoma pluća (300–303). Alimirah i sur. su našli da miRNA-214 također cilja gen *SUFU*, što potom rezultira inhibicijom njegove ekspresije u karcinomu dojke (301). Isto je potvrđeno u drugom istraživanju, gdje je nađena negativna korelacija između genske ekspresije *SUFU* i ekspresije miRNA-214 u napredovanju fibroze jetre, što ukazuje na to da miRNA-214 direktno cilja gensku ekspresiju *SUFU* i signalni put Hh (304).

Nadalje, istraživanje He i sur. je pokazalo da je miR-214-3p-*SUFU*-*GLI1* signaliziranje važno u kontroliranju neointimalne hiperplazije zato što je odgovorno za diferencijaciju i generiranje glatkih mišićnih stanica (engl. *Smooth muscle cell*, SMC) iz matičnih stanica u adventiciji (engl. *Adventitial stem progenitor cells*, AdSPCs). MiR-214-3p kontrolira proliferaciju i migraciju vaskularnih SMC, dok je *SUFU* ciljni gen koji djeluje kao transkripcijski represor kontraktilnih gena u SMC, što je važno u vaskularnom remodeliranju nakon ozlijede (305).

Nađeno je da miR-378a-5p negativno regulira ekspresiju *SUFU* kao ciljnog gena u melanomu. To je važno jer je pokazano da miR-378a-5p povećava migraciju i invaziju stanica te da djeluje kao pokretač angiogeneze s obzirom da značajno potiče sekreciju VEGF-a, koji povećava angiogenezu *in vivo* i *in vitro* (306). Istraživanja su pokazala da upravo pojačavajući ekspresiju VEGF-a, miR-378a-5p potiče neovaskularizaciju tkiva u hipoksiji ciljajući gen *SUFU* (44,219).

S obzirom da su studije na različitim tkivima pokazale da miR-214-3p i miR-378a-5p moduliraju ekspresiju *SUFU*, željeli smo vidjeti njihov mogući utjecaj na regulaciju ekspresije

*SUFU* u posteljicama, te napose u IUGR-u. To je naročito zanimljivo s obzirom na ulogu spomenutih miRNA u vaskularnom remodeliranju i angiogenezi.

Naši rezultati su pokazali da je ekspresija miR-214-3p i miR-378a-5p povećana u posteljicama iz urednih trudnoća u odnosu na posteljice iz trudnoća s IUGR-om. Ti su rezultati u skladu s rezultatima koje smo dobili vezano za proteinsku ekspresiju *SUFU*, s obzirom da je povećana proteinska ekspresija *SUFU* viđena u terminskim posteljicama iz trudnoća s IUGR-om, u usporedbi s urednim posteljicama. Naši rezultati upućuju na to da bi miR-214-3p i miR-378a-5p posredovanje moglo biti uključeno u epigenetsku regulaciju genske ekspresije *SUFU* u posteljicama iz urednih i trudnoća s IUGR-om.

S obzirom da su različite posteljične miRNA detektabilne u serumu trudnica (242), poznavanje njihove uloge u molekularnim mehanizmima koji su u podlozi patoloških procesa u posteljici moglo bi u konačnici poslužiti za izradu novih markera bolesti i mogućih novih lijekova te preventivnih postupaka u trudnoći.

Postoji nekoliko ograničavajućih faktora u našem istraživanju. Naš ispitivani uzorak nije vrlo velik te bi bilo zanimljivo vidjeti jesu li rezultati u korelaciji s našima i u slučaju velikih skupina. Bilo bi također zanimljivo fokusirati se i na preostale epigenetske mehanizme osim miR-214-3p i miR-378a-5p i DNA metilacije u posteljicama s IUGR-om te bi to mogao biti predmet naših predstojećih istraživanja. Naše istraživanje pruža nove spoznaje o uključenosti signalnih puteva Wnt i Hh u epigenetsku regulaciju ekspresije gena *SUFU* u posteljica s IUGR-om. Daljnjim istraživanjima na tragu našega bi se moglo pobliže i potanko rasvijetliti točnu ulogu tih mehanizama u placentarnoj insuficijenciji što bi moglo pomoći u detekciji i praćenju trudnoća s IUGR-om i pravovremenom planiranju porođaja te povoljnom neonatalnom ishodu djece rođene s IUGR-om.

## 7. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Dob majke je statistički značajno viša u skupini trudnica s IUGR-om u odnosu na dob trudnica u kontrolnoj skupini.
2. Proteinska ekspresija WNT5A je statistički značajno viša u endotelu u posteljicama iz trudnoća s IUGR-om u odnosu na posteljice iz urednih trudnoća.
3. Proteinska ekspresija  $\beta$ -katenina je statistički značajno viša u trofoblastu i endotelu u posteljicama iz trudnoća s IUGR-om u odnosu na posteljice iz urednih trudnoća.
4. Proteinska ekspresija SUFU je statistički značajno viša u trofoblastu u posteljicama iz trudnoća s IUGR-om u odnosu na posteljice iz urednih trudnoća.
5. Promotor gena *SUFU* je nemetiliran i u uzorcima posteljica iz urednih trudnoća i u uzorcima posteljica iz trudnoća s IUGR-om.
6. Ekspresija miR-214-3p i miR-378a-5p je statistički značajno viša u posteljicama iz urednih trudnoća u odnosu na posteljice iz trudnoća s IUGR-om.
7. Korelacijskom analizom proteinske ekspresije  $\beta$ -katenina i SUFU nađeno je da su u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji u endotelu posteljica iz trudnoća s IUGR-om.
8. Korelacijskom analizom proteinske ekspresije WNT5A,  $\beta$ -katenina i SUFU nije nađena statistički značajna korelacija u trofoblastu ili u stromi posteljica iz trudnoća s IUGR-om, a isto vrijedi i za korelacijsku analizu sva tri proteina u posteljicama iz urednih trudnoća.

## 8. SAŽETAK

Jedan od najčešćih uzroka intrauterinog zastoja u rastu (IUGR) je nedostatna funkcija posteljice. IUGR se pojavljuje u oko 10% trudnoća te uzrokuje povećanje fetalnog i neonatalnog morbiditeta i mortaliteta. Unatoč presudnoj ulozi signalnih puteva Wnt i Hedgehog (Hh) u embrionalnom razvoju te razvoju posteljice, njihova uloga u nastanku IUGR-a još nije dovoljno istražena. U ovoj je studiji analizirana ekspresija pozitivnih regulatora signalnog puta Wnt, proteina WNT5A i  $\beta$ -katenina, te ekspresija proteina SUFU koji je negativni regulator signalnog puta Hh. Proteinska ekspresija je analizirana imunohistokemijom (IHC) u uzorcima 34 posteljice s IUGR-om te 18 posteljica iz urednih jednoplodnih terminskih trudnoća te dodatno provjerena na razini mRNA metodom analize reverzne transkripcije i kvantitativne lančane reakcije polimerazom (RT-qPCR). Epigenetski mehanizmi regulacije ekspresije gena *SUFU* istraženi su određivanjem metilacijskog obrasca DNA u promotoru gena *SUFU* PCR-om ovisnim o metilaciji (MSP) te RT-qPCR analizom ekspresije miR-214-3p i miR-378a-5p. Proteinska ekspresija WNT5A je bila viša u endotelnim stanicama posteljičnih resica kod IUGR-a u odnosu na kontrolnu skupinu. Proteinska ekspresija  $\beta$ -katenina je bila povišena u trofoblastu i endotelnim stanicama kod IUGR-a, dok je proteinska ekspresija SUFU bila povišena u trofoblastu posteljica s IUGR-om. Promotor gena *SUFU* je ostao nemetiliran u obje skupine, dok je kod posteljica s IUGR-om nađena smanjena ekspresija miR-214-3p i miR-378a-5p. Povišena proteinska ekspresija SUFU u posteljica s IUGR-om u kontekstu također povišene proteinske ekspresije WNT5A i  $\beta$ -katenina potvrđene i korelacijskom analizom proteinske ekspresije  $\beta$ -katenina i SUFU ukazuje na moguću ulogu SUFU kao pozitivnog i negativnog regulatora u integriranju signalnih puteva Wnt i Hh u posteljica s IUGR-om. Čini se da bi miRNA, a ne DNA metilacija, mogao biti epigenetski mehanizam u reguliranju genske ekspresije *SUFU* u patogenezi posteljica sa IUGR-om.

Ključne riječi - intrauterini zastoj u rastu - IUGR, posteljica, WNT5A,  $\beta$ -katenin, SUFU, signalni put Wnt, signalni put Hh, DNA metilacija, miRNA

## 9. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU

### SUFU protein's function in connecting Wnt and Hedgehog signaling pathways in placentas with intrauterine growth restriction

Ida Marija Šola, 2024.

Placental insufficiency is one of the most common causes of intrauterine growth restriction (IUGR). IUGR affects ~10% of pregnancies and increases fetal and neonatal morbidity and mortality. Although Wnt and Hh pathways are crucial for embryonic development and placentation, their role in the pathology of IUGR is still not sufficiently explored.

The present study analyzed the expression of positive regulators of the Wnt signaling pathway, WNT5A, and  $\beta$ -catenin, and the expression of the Hh signaling pathway negative regulator, suppressor of fused (SUFU). Immunohistochemical and reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) assays were performed on 34 IUGR and 18 placental tissue samples from physiologic singleton term-pregnancies. Epigenetic mechanisms of SUFU gene regulation were also investigated by methylation-specific PCR analysis of its promoter and RT-qPCR analysis of miR-214-3p and miR-378a-5p expression. WNT5A protein expression was higher in endothelial cells of placental villi from IUGR group compared with controls. That was also the case for the expression of  $\beta$ -catenin protein in trophoblasts and endothelial cells and SUFU protein in trophoblasts from IUGR placentas. The SUFU gene promoter remained unmethylated in all tissue samples, while miR-214-3p and miR-378a-5p were downregulated in IUGR. The present results of higher SUFU protein expression in IUGR placentas in the context of higher WNT5A and  $\beta$ -catenin protein expression confirmed with SUFU and  $\beta$ -catenin protein expression correlation analysis suggest a possible function of SUFU as both a positive and negative regulator in the integration of Wnt and Hh signaling in IUGR. DNA methylation did not appear to be a mechanism of SUFU regulation in the pathogenesis of IUGR, but its expression could be regulated by miRNA targeting.

Keywords - intrauterine growth restriction - IUGR, placenta, WNT5A,  $\beta$ -catenin, SUFU, Wnt signaling pathway, Hh signaling pathway, DNA methylation, miRNA

## 10. POPIS LITERATURE

1. Wang Y ZS. Introduction. U: Vascular Biology of the Placenta. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
2. Koukoura O, Sifakis S, Spandidos DA. DNA methylation in the human placenta and fetal growth. *Mol Med Rep.* 2012;5(4):883–9.
3. Knöfler M, Pollheimer J. Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Front Genet.* 2013;4:190.
4. Matsuura K, Jigami T, Taniue K, Morishita Y, Adachi S, Senda T, i sur. Identification of a link between Wnt/ $\beta$ -catenin signalling and the cell fusion pathway. *Nat Commun.* 2011;2:548.
5. Pollack RN, Divon MY. Intrauterine growth retardation: definition, classification, and etiology. *Clin Obstet Gynecol.* 1992;35(1):99–107.
6. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice bulletin no. 134: fetal growth restriction. *Obstet Gynecol.* 2013;121(5):1122–33.
7. Krishna U, Bhalerao S. Placental insufficiency and fetal growth restriction. *J Obstet Gynaecol India.* 2011;61(5):505–11.
8. Huppertz B. Placental Origins of Preeclampsia. *Hypertension.* 2008;51(4):970–5.
9. Hutter D, Kingdom J, Jaeggi E. Causes and mechanisms of intrauterine hypoxia and its impact on the fetal cardiovascular system: a review. *Int J Pediatr.* 2010;2010:401323.
10. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *EMBO J.* 2012;31(12):2714–36.
11. Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent  $\beta$ -catenin degradation. *J Cell Biol.* 2003;162(5):899–908.

12. Cha J, Bartos A, Park C, Sun X, Li Y, Cha SW, i sur. Appropriate crypt formation in the uterus for embryo homing and implantation requires Wnt5a-ROR signaling. *Cell Rep.* 2014;8(2):382–92.
13. Nishita M, Yoo SK, Nomachi A, Kani S, Sougawa N, Ohta Y, i sur. Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. *J Cell Biol.* 2006;175(4):555–62.
14. Wu F, Zhang Y, Sun B, McMahon AP, Wang Y. Hedgehog Signaling: From Basic Biology to Cancer Therapy. *Cell Chem Biol.* 2017;24(3):252–80.
15. Baron M. Induction of embryonic hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells by hedgehog-mediated signals. *Differentiation.* 2001;68(4–5):175–85.
16. Byrd N, Grabel L. Hedgehog Signaling in Murine Vasculogenesis and Angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14(8):308–13.
17. Tang C, Tang L, Wu X, Xiong W, Ruan H, Hussain M, i sur. Glioma-associated Oncogene 2 Is Essential for Trophoblastic Fusion by Forming a Transcriptional Complex with Glial Cell Missing-a. *J Biol Chem.* 2016;291(11):5611–22.
18. Tang C, Mei L, Pan L, Xiong W, Zhu H, Ruan H, i sur. Hedgehog signaling through GLI1 and GLI2 is required for epithelial-mesenchymal transition in human trophoblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1850(7):1438–48.
19. Stone DM, Murone M, Luoh S, Ye W, Armanini MP, Gurney A, i sur. Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J Cell Sci.* 1999;112 ( Pt 23):4437–48.
20. Huang D, Wang Y, Tang J, Luo S. Molecular mechanisms of suppressor of fused in regulating the hedgehog signalling pathway. *Oncol Lett.* 2018;15(5):6077-86.
21. Min TH, Kriebel M, Hou S, Pera EM. The dual regulator Sufu integrates Hedgehog and Wnt signals in the early *Xenopus* embryo. *Dev Biol.* 2011;358(1):262–76.
22. Murray MA. The bundle of life. *Ancient Egypt.* 1930;3:65–73.

23. Longo LD, Reynolds LP. Some historical aspects of understanding placental development, structure and function. *Int J Dev Biol.* 2010;54(2–3):237–55.
24. DE Witt F. An Historical Study on Theories of the Placenta to 1900. *J Hist Med Allied Sci.* 1959;XIV(7):360–74.
25. Guttmacher AE, Maddox YT, Spong CY. The Human Placenta Project: placental structure, development, and function in real time. *Placenta.* 2014;35(5):303–4.
26. Serman A, Simon F, Fabijanovic D, Serman L. Epigenetic control of cell invasion – the trophoblast model. *Biomol Concepts.* 2012;3(6):487–94.
27. Đelmiš J, Orešković S. *Fetalna medicina i opstetricija.* Zagreb: Medicinska naklada; 2014. Str. 385-94.
28. Kos M, Leniček T. *Osnove patologije posteljice.* Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
29. Vrhovac Madunić I, Karin-Kujundžić V, Madunić J, Šola IM, Šerman L. Endometrial Glucose Transporters in Health and Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:703671.
30. Herrick EJ, Bordoni B. *Embryology, Placenta.* [Internet]. StatPearls Publishing; 2023. [ažurirano 01.05.2023.; pristupljeno 04.05.2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53251/>
31. Blaschitz A, Hutter H, Dohr G. HLA Class I protein expression in the human placenta. *Early pregnancy (Cherry Hill);* 2001;5(1):67–9.
32. Serman A, Serman L. Development of placenta in a rodent - model for human placentation. *Front Biosc (Elite ed.).* 2011;3(1):233-9.
33. Šerman L, Šerman A. Uloga glikoproteina u procesima implantacije i placentacije. *Gynaecol et Perinatol.* 2006;15(2):82–8.
34. AMBOSS. Structure of mature placenta [slika s interneta]. 2022 Apr 27 [pristupljeno 05.04.2023.]. Dostupno na: [www.amboss.com/us/knowledge/The\\_placenta,\\_umbilical\\_cord,\\_and\\_amniotic\\_sac](http://www.amboss.com/us/knowledge/The_placenta,_umbilical_cord,_and_amniotic_sac)



35. Gupta SK, Malhotra SS, Malik A, Verma S, Chaudhary P. Cell Signaling Pathways Involved During Invasion and Syncytialization of Trophoblast Cells. *Am J Reprod Immunol.* 2016;75(3):361–71.
36. Cierna Z, Varga I, Danihel L, Kuracinova K, Janegova A, Danihel L. Intermediate trophoblast--A distinctive, unique and often unrecognized population of trophoblastic cells. *Ann Anat.* 2016;204:45–50.
37. Windsperger K, Dekan S, Pils S, Golletz C, Kunihs V, Fiala C, i sur. Extravillous trophoblast invasion of venous as well as lymphatic vessels is altered in idiopathic, recurrent, spontaneous abortions. *Hum Reprod.* 2017;32(6):1208–17.
38. 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(4):1105–14.
39. Aplin JD, Haigh T, Jones CJ, Church HJ, Vićovac L. Development of cytotrophoblast columns from explanted first-trimester human placental villi: role of fibronectin and integrin alpha5beta1. *Biol Reprod.* 1999;60(4):828–38.
40. Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta.* 2006;27(9–10):939–58.
41. Hustin J, Jauniaux E, Schaaps JP. Histological study of the materno-embryonic interface in spontaneous abortion. *Placenta.* 1990;11(6):477–86.
42. Zhang C, Tannous E, Zheng JJ. Oxidative stress upregulates Wnt signaling in human retinal microvascular endothelial cells through activation of disheveled. *J Cell Biochem.* 2019;120(8):14044–54.
43. Spillmann F, van Linthout S, Miteva K, Lorenz M, Stangl V, Schultheiss HP, i sur. LXR agonism improves TNF- $\alpha$ -induced endothelial dysfunction in the absence of its cholesterol-modulating effects. *Atherosclerosis.* 2014;232(1):1–9.
44. Hua Z, Lv Q, Ye W, Wong CKA, Cai G, Gu D, i sur. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS One.* 2006;1(1):e116.

45. Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, i sur. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;187(1–2):207–12.
46. Kaufmann P, Sen DK, Schweikhart G. Classification of human placental villi. I. Histology. *Cell Tissue Res.* 1979;200(3):409–23.
47. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9(6):653–60.
48. Wigglesworth JS. Vascular organization of the human placenta. *Nature.* 1967;216(5120):1120–1.
49. Sheiner E, Shoham-Vardi I, Hallak M, Hadar A, Gortzak-Uzan L, Katz M, i sur. Placental abruption in term pregnancies: clinical significance and obstetric risk factors. *J. Matern.-Fetal Neonatal Med.* 2003;13(1):45–9.
50. Clausson B, Lichtenstein P, Cnattingius S. Genetic influence on birthweight and gestational length determined by studies in offspring of twins. *BJOG.* 2000;107(3):375–81.
51. Lunde A, Melve KK, Gjessing HK, Skjaerven R, Irgens LM. Genetic and environmental influences on birth weight, birth length, head circumference, and gestational age by use of population-based parent-offspring data. *Am J Epidemiol.* 2007;165(7):734–41.
52. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Dashe JS, Hoffman BL, Casey BM, i sur., ur. *Williams Obstetrics*, 25. izd. New York: McGraw Hill; 2018.
53. Resnik R. Intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol.* 2002;99(3):490–6.
54. Hanson M, Kiserud T, Visser GHA, Brocklehurst P, Schneider EB. Optimal fetal growth: a misconception? *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(3):332.e1-4.
55. Dražančić A. Krivulje fetalnog rasta, usporeni fetalni i fetalna dismaturnost.. *Gynaecol Perinatol.* 2009;18(1):1–12.

56. Kiserud T, Piaggio G, Carroli G, Widmer M, Carvalho J, Neerup Jensen L, i sur. The World Health Organization Fetal Growth Charts: A Multinational Longitudinal Study of Ultrasound Biometric Measurements and Estimated Fetal Weight. *PLoS Med.* 2017;14(1):e1002220.
57. Papageorghiou AT, Ohuma EO, Altman DG, Todros T, Cheikh Ismail L, Lambert A, i sur. International standards for fetal growth based on serial ultrasound measurements: the Fetal Growth Longitudinal Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet.* 2014;384(9946):869–79.
58. Hocquette A, Durox M, Wood R, Klungsøyr K, Szamotulska K, Berrut S, i sur. International versus national growth charts for identifying small and large-for-gestational age newborns: A population-based study in 15 European countries. *Lancet Reg Health Eur.* 2021;8:100167.
59. Price CR, Roeckner J, Odibo L, Odibo A. Comparing fetal biometric growth velocity versus estimated fetal weight for prediction of neonatal small for gestational age. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2022;35(20):3931–6.
60. Chen HY, Chauhan SP, Salm Ward TC, Mori N, Gass ET, Cisler RA. Aberrant fetal growth and early, late, and postneonatal mortality: an analysis of Milwaukee births, 1996–2007. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;204(3):261.e1-261.e10.
61. Levine TA, Grunau RE, McAuliffe FM, Pinnamaneni R, Foran A, Alderdice FA. Early childhood neurodevelopment after intrauterine growth restriction: a systematic review. *Pediatrics.* 2015;135(1):126–41.
62. Devaskar SU, Chu A. Intrauterine Growth Restriction: Hungry for an Answer. *Physiology (Bethesda).* 2016;31(2):131–46.
63. American College of Obstetricians and Gynecologists. Fetal Growth Restriction: ACOG Practice Bulletin, Number 227. *Obstetrics and gynecology.* 2021;137(2):e16–28.

64. Lees C, Marlow N, Arabin B, Bilardo CM, Brezinka C, Derks JB, i sur. Perinatal morbidity and mortality in early-onset fetal growth restriction: cohort outcomes of the trial of randomized umbilical and fetal flow in Europe (TRUFFLE). *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;42(4):400–8.
65. Battaglia FC, Lubchenco LO. A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. *J Pediatr.* 1967;71(2):159–63.
66. Manning F. *Fetal medicine: Principal and Practice.* Norwalk, CT: Appleton & Lange; 1995. Str. 317
67. Pritchard NL, Hiscock RJ, Lockie E, Permezel M, McGauren MFG, Kennedy AL, i sur. Identification of the optimal growth charts for use in a preterm population: An Australian state-wide retrospective cohort study. *PLoS Med.* 2019;16(10):e1002923.
68. Lee AC, Kozuki N, Cousens S, Stevens GA, Blencowe H, Silveira MF, i sur. Estimates of burden and consequences of infants born small for gestational age in low and middle income countries with INTERGROWTH-21st standard: analysis of CHERG datasets. *BMJ.* 2017;358:j3677.
69. Gülmezoglu AM, Hofmeyr GJ. Bed rest in hospital for suspected impaired fetal growth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;1996(2):CD000034.
70. Rodger MA, Gris JC, de Vries JIP, Martinelli I, Rey É, Schleussner E, i sur. Low-molecular-weight heparin and recurrent placenta-mediated pregnancy complications: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet.* 2016;388(10060):2629–41.
71. Roberge S, Nicolaides K, Demers S, Hyett J, Chaillet N, Bujold E. The role of aspirin dose on the prevention of preeclampsia and fetal growth restriction: systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2017;216(2):110-120.e6.
72. Fleiss B, Wong F, Brownfoot F, Shearer IK, Baud O, Walker DW, i sur. Knowledge Gaps and Emerging Research Areas in Intrauterine Growth Restriction-Associated Brain Injury. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:188.

73. Klebanoff MA, Meirik O, Berendes HW. Second-generation consequences of small-for-dates birth. *Pediatrics*. 1989;84(2):343–7.
74. Wen SW, Goldenberg RL, Cutter GR, Hoffman HJ, Cliver SP. Intrauterine growth retardation and preterm delivery: prenatal risk factors in an indigent population. *Am J Obstet Gynecol*. 1990;162(1):213–8.
75. Smith CA. Effects of maternal under nutrition upon the newborn infant in Holland (1944-1945). *J Pediatr*. 1947;30(3):229–43.
76. Suhag A, Berghella V. Intrauterine Growth Restriction (IUGR): Etiology and Diagnosis. *Curr Obstet Gynecol Rep*. 2013;2(2):102–11.
77. Zhu JL, Obel C, Hammer Bech B, Olsen J, Basso O. Infertility, Infertility Treatment, and Fetal Growth Restriction. *Obstet Gynecol*. 2007;110(6):1326–34.
78. Ahlborg L, Ek S, Fridström M, Kublickas M, Leijon M, Nisell H. Is fetal growth impaired after *in vitro* fertilization? *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2006;85(2):195–9.
79. Shinohara S, Hirata S, Suzuki K. Association between infertility treatment and intrauterine growth: a multilevel analysis in a retrospective cohort study. *BMJ Open*. 2020;10(4):e033675.
80. Mendez H. Introduction to the study of pre- and postnatal growth in humans: a review. *Am J Med Genet*. 1985;20(1):63–85.
81. Stipoljev F, Latin V, Kos M, Miskovic B, Kurjak A. Correlation of confined placental mosaicism with fetal intrauterine growth retardation. A case control study of placentas at delivery. *Fetal Diagn Ther*. 2001;16(1):4–9.
82. Wilkins-Haug L, Quade B, Morton CC. Confined placental mosaicism as a risk factor among newborns with fetal growth restriction. *Prenat Diagn*. 2006;26(5):428–32.
83. Balayla J, Desilets J, Shrem G. Placenta previa and the risk of intrauterine growth restriction (IUGR): a systematic review and meta-analysis. *J Perinat Med*. 2019;47(6):577–84.

84. Dražančić A, Grizelj V, Kuvačić I, Latin-Milković V. Porodništvo. 2. izd. Zagreb: Školska Knjiga; 1999.
85. Chang TC, Robson SC, Boys RJ, Spencer JA. Prediction of the small for gestational age infant: which ultrasonic measurement is best? *Obstetrics and gynecology*. 1992;80(6):1030–8.
86. Hecher K, Snijders R, Campbell S, Nicolaides K. Fetal venous, intracardiac, and arterial blood flow measurements in intrauterine growth retardation: relationship with fetal blood gases. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;173(1):10–5.
87. Tudehope D, Vento M, Bhutta Z, Pachi P. Nutritional requirements and feeding recommendations for small for gestational age infants. *J Pediatr*. 2013;162(3 Suppl):S81-9.
88. Lapillonne A, Braillon P, Claris O, Chatelain PG, Delmas PD, Salle BL. Body composition in appropriate and in small for gestational age infants. *Acta Paediatr*. 1997;86(2):196–200.
89. Piro E, Serra G, Schierz IA, Giuffrè M, Corsello G. Fetal growth restriction: a growth pattern with fetal, neonatal and long-term consequences. *Euromediterranean Biomedical Journal*. 2019;14(09):038-44.
90. Meler E, Sisterna S, Borrell A. Genetic syndromes associated with isolated fetal growth restriction. *Prenat Diagn*. 2020;40(4):432–46.
91. Sharma D, Shastri S, Sharma P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clin Med Insights Pediatr*. 2016;10:67–83.
92. Hugh O, Williams M, Turner S, Gardosi J. Reduction of stillbirths in England from 2008 to 2017 according to uptake of the Growth Assessment Protocol: 10-year population-based cohort study. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2021;57(3):401–8.
93. Baschat AA, Gembruch U, Harman CR. The sequence of changes in Doppler and biophysical parameters as severe fetal growth restriction worsens. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001;18(6):571–7.

94. Martins JG, Biggio JR, Abuhamad A. Society for Maternal-Fetal Medicine Consult Series #52: Diagnosis and management of fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2020;223(4):B2–17.
95. Lalor JG, Fawole B, Alfirevic Z, Devane D. Biophysical profile for fetal assessment in high risk pregnancies. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;2008(1):CD000038.
96. Dayal AK, Manning FA, Berck DJ, Mussalli GM, Avila C, Harman CR, i sur. Fetal death after normal biophysical profile score: An eighteen-year experience. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181(5 Pt 1):1231–6.
97. Alfirevic Z, Stampalija T, Gyte GML. Fetal and umbilical Doppler ultrasound in high-risk pregnancies. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;2013(11):CD007529.
98. Society for Maternal-Fetal Medicine Publications Committee, Berkley E, Chauhan SP, Abuhamad A. Doppler assessment of the fetus with intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;206(4):300–8.
99. Baschat AA. Fetal growth restriction - from observation to intervention. *J Perinat Med.* 2010;38(3):239–46.
100. Kurjak A. Zastoj u rastu fetusa. U: Kuvačić I, kurjak A, Đelmiš J., ur. *Porodništvo.* Zagreb: Medicinska naklada; 2009. Str. 351–7.
101. Kurjak A. Fetalni rast. U: Matijević R, Kurjak A i sur., ur. *Ginekologija i perinatologija.* Varaždinske Toplice: Tonomir; 2003. Str. 259–78.
102. Stockley EL, Ting JY, Kingdom JC, McDonald SD, Barrett JF, Synnes AR, i sur. Intrapartum magnesium sulfate is associated with neuroprotection in growth-restricted fetuses. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;219(6):606.e1-606.e8.
103. GRIT Study Group. When do obstetricians recommend delivery for a high-risk preterm growth-retarded fetus? The GRIT Study Group. Growth Restriction Intervention Trial. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1996;67(2):121–6.

104. Thornton JG, Hornbuckle J, Vail A, Spiegelhalter DJ, Levene M, GRIT study group. Infant wellbeing at 2 years of age in the Growth Restriction Intervention Trial (GRIT): multicentred randomised controlled trial. *Lancet*. 364(9433):513–20.
105. Boers KE, Vijgen SMC, Bijlenga D, van der Post JAM, Bekedam DJ, Kwee A, i sur. Induction versus expectant monitoring for intrauterine growth restriction at term: randomised equivalence trial (DIGITAT). *BMJ*. 2010;341:c7087.
106. Pilliod RA, Cheng YW, Snowden JM, Doss AE, Caughey AB. The risk of intrauterine fetal death in the small-for-gestational-age fetus. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;207(4):318.e1-6.
107. Baschat AA, Cosmi E, Bilardo CM, Wolf H, Berg C, Rigano S, i sur. Predictors of neonatal outcome in early-onset placental dysfunction. *Obstet. Gynecol*. 2007;109(2 Pt 1):253–61.
108. Malin G, Morris R, Riley R, Teune M, Khan K. When is birthweight at term abnormally low? A systematic review and meta-analysis of the association and predictive ability of current birthweight standards for neonatal outcomes. *BJOG*. 2014;121(5):515–26.
109. Ray JG, Park AL, Fell DB. Mortality in Infants Affected by Preterm Birth and Severe Small-for-Gestational Age Birth Weight. *Pediatrics*. 2017;140(6):e20171881.
110. Mlynarczyk M, Chauhan SP, Baydoun HA, Wilkes CM, Earhart KR, Zhao Y, i sur. The clinical significance of an estimated fetal weight below the 10th percentile: a comparison of outcomes of <5th vs 5th-9th percentile. *Am J Obstet Gynecol*. 2017;217(2):198.e1-198.e11.
111. Unterscheider J, Daly S, Geary MP, Kennelly MM, McAuliffe FM, O'Donoghue K, i sur. Optimizing the definition of intrauterine growth restriction: the multicenter prospective PORTO Study. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;208(4):290.e1-6.
112. Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, Ohlsson A, Golan A. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;182(1 Pt 1):198–206.



113. Zeitlin J, el Ayoubi M, Jarreau PH, Draper ES, Blondel B, Künzel W, i sur. Impact of fetal growth restriction on mortality and morbidity in a very preterm birth cohort. *J Pediatr.* 2010;157(5):733-9.e1.
114. Doctor BA, O’Riordan MA, Kirchner HL, Shah D, Hack M. Perinatal correlates and neonatal outcomes of small for gestational age infants born at term gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185(3):652–9.
115. Kramer MS, Olivier M, McLean FH, Willis DM, Usher RH. Impact of intrauterine growth retardation and body proportionality on fetal and neonatal outcome. *Pediatrics.* 1990;86(5):707–13.
116. Ferguson AC. Prolonged impairment of cellular immunity in children with intrauterine growth retardation. *J Pediatr.* 1978;93(1):52–6.
117. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ.* 1995;311(6998):171–4.
118. Spence D, Alderdice FA, Stewart MC, Halliday HL, Bell AH. Does intrauterine growth restriction affect quality of life in adulthood? *Arch Dis Child.* 2007;92(8):700–3.
119. Løhaugen GCC, Østgård HF, Andreassen S, Jacobsen GW, Vik T, Brubakk AM, i sur. Small for gestational age and intrauterine growth restriction decreases cognitive function in young adults. *J Pediatr.* 2013;163(2):447–53.
120. Eves R, Mendonça M, Bartmann P, Wolke D. Small for gestational age-cognitive performance from infancy to adulthood: an observational study. *BJOG.* 2020;127(13):1598–606.
121. Huangfu D, Anderson KV. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development.* 2006;133(1):3–14.
122. Nusse R, van Ooyen A, Cox D, Fung YK, Varmus H. Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature.* 307(5947):131–6.

123. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, i sur. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell*. 1991;64(2):231.
124. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008;4(2):68–75.
125. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006;127(3):469–80.
126. Sonderegger S, Haslinger P, Sabri A, Leisser C, Otten J v., Fiala C, i sur. Wingless (Wnt)-3A Induces Trophoblast Migration and Matrix Metalloproteinase-2 Secretion through Canonical Wnt Signaling and Protein Kinase B/AKT Activation. *Endocrinology*. 2010;151(1):211–20.
127. Geng M. Loss of Wnt5a and Ror2 protein in hepatocellular carcinoma associated with poor prognosis. *World J Gastroenterol*. 2012;18(12):1328.
128. Bui T, Zhang L, Rees M, Bicknell R, Harris A. Expression and hormone regulation of Wnt2, 3, 4, 5a, 7a, 7b and 10b in normal human endometrium and endometrial carcinoma. *Br J Cancer*. 1997;75(8):1131–6.
129. Serman L, Nikuseva Martic T, Vranic S. T-cell factor 1 expression in germ cell tumors with trophoblastic differentiation. *Pathol Int*. 2014;64(2):86–7.
130. Ge JF, Xu YY, Qin G, Cheng JQ, Chen FH. Resveratrol Ameliorates the Anxiety- and Depression-Like Behavior of Subclinical Hypothyroidism Rat: Possible Involvement of the HPT Axis, HPA Axis, and Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:44.
131. Zmijanac Partl J, Karin V, Skrtic A, Nikuseva-Martic T, Serman A, Mlinarec J, et al. Negative regulators of Wnt signaling pathway SFRP1 and SFRP3 expression in preterm and term pathologic placentas. *T J Matern Fetal Neonatal Med*. 2018;31(22):2971-2979.
132. Partl JZ, Fabijanovic D, Skrtic A, Vranic S, Martic TN, Serman L. Immunohistochemical Expression of SFRP1 and SFRP3 Proteins in Normal and Malignant Reproductive Tissues of Rats and Humans. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014;22(9):681-7.

133. Herr P, Hausmann G, Basler K. WNT secretion and signalling in human disease. *Trends Mol Med.* 2012;18(8):483–93.
134. Kilian B, Mansukoski H, Barbosa FC, Ulrich F, Tada M, Heisenberg CP. The role of Ppt/Wnt5 in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation. *Mech Dev.* 2003;120(4):467–76.
135. Nishita M, Enomoto M, Yamagata K, Minami Y. Cell/tissue-tropic functions of Wnt5a signaling in normal and cancer cells. *Trends Cell Biol.* 2010;20(6):346–54.
136. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, et al. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature.* 1996;382(6588):225–30.
137. Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature.* 1996;382(6592):638–42.
138. Huelsken J, Vogel R, Brinkmann V, Erdmann B, Birchmeier C, Birchmeier W. Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol.* 2000;148(3):567–78.
139. Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, et al. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* 2002;16(9):1066–76.
140. Glibo M, Serman A, Karin-Kujundzic V, Bekavac Vlatkovic I, Miskovic B, Vranic S, et al. The role of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in cancer with emphasis on ovarian cancer development and progression: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2021;21(1):5-18.
141. von Kries JP, Winbeck G, Asbrand C, Schwarz-Romond T, Sochnikova N, Dell’Oro A, et al. Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC. *Nat Struct Biol.* 2000;7(9):800–7.

142. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, i sur. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC<sup>-/-</sup> colon carcinoma. *Science*. 1997;275(5307):1784–7.
143. Wallingford JB, Habas R. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development*. 2005;132(20):4421–36.
144. Schwarz-Romond T, Fiedler M, Shibata N, Butler PJG, Kikuchi A, Higuchi Y, i sur. The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14(6):484–92.
145. Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Plevoy GA, Clevers H, i sur. Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*. 1998;395(6702):604–8.
146. Bottomly D, Kyler SL, McWeeney SK, Yochum GS. Identification of {beta}-catenin binding regions in colon cancer cells using ChIP-Seq. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(17):5735–45.
147. Yamaguchi TP. Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr Biol*. 2001;11(17):R713-24.
148. Cadigan KM, Peifer M. Wnt Signaling from Development to Disease: Insights from Model Systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(2):a002881–a002881.
149. Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 3):395–402.
150. Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*. 1998;391(6665):357–62.
151. Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, i sur. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature*. 1999;398(6726):431–6.

152. Hoang BH, Thomas JT, Abdul-Karim FW, Correia KM, Conlon RA, Luyten FP, i sur. Expression pattern of two Frizzled-related genes, Frzb-1 and Sfrp-1, during mouse embryogenesis suggests a role for modulating action of Wnt family members. *Dev Dyn*. 1998;212(3):364-72.
153. Salik B, Yi H, Hassan N, Santiappillai N, Vick B, Connerty P, i sur. Targeting RSPO3-LGR4 Signaling for Leukemia Stem Cell Eradication in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*. 2020;38(2):263-278.e6.
154. Soleas JP, D’Arcangelo E, Huang L, Karoubi G, Nostro MC, McGuigan AP, i sur. Assembly of lung progenitors into developmentally-inspired geometry drives differentiation via cellular tension. *Biomaterials*. 2020;254:120128.
155. Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17(1):45–51.
156. Lucero OM, Dawson DW, Moon RT, Chien AJ. A re-evaluation of the “oncogenic” nature of Wnt/beta-catenin signaling in melanoma and other cancers. *Curr Oncol Rep*. 2010;12(5):314–8.
157. Perry JM, Tao F, Roy A, Lin T, He XC, Chen S, i sur. Overcoming Wnt- $\beta$ -catenin dependent anticancer therapy resistance in leukaemia stem cells. *Nat Cell Biol*. 2020;22(6):689–700.
158. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*. 2004;131(8):1663–77.
159. Serman L, Nikuseva Martic 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.
160. Li J, Sutter C, Parker DS, Blauwkamp T, Fang M, Cadigan KM. CBP/p300 are bimodal regulators of Wnt signaling. *EMBO J*. 2007;26(9):2284–94.
161. Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in cancer. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1):165.
162. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A Second Canon. *Dev Cell*. 2003;5(3):367–77.

163. Lu W, Yamamoto V, Ortega B, Baltimore D. Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell*. 2004;119(1):97–108.
164. Marlow F, Topczewski J, Sepich D, Solnica-Krezel L. Zebrafish Rho Kinase 2 Acts Downstream of Wnt11 to Mediate Cell Polarity and Effective Convergence and Extension Movements. *Curr. Biol*. 2002;12(11):876–84.
165. Wang Y. Wnt/Planar cell polarity signaling: A new paradigm for cancer therapy. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(8):2103–9.
166. Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling:  $\beta$ -Catenin-independent pathways. *Cell Calcium*. 2005;38(3–4):439–46.
167. Slusarski DC, Pelegri F. Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. *Dev Biol*. 2007;307(1):1–13.
168. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N, et al. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature*. 1999;399(6738):798–802.
169. Chen Q, Zhang Y, Lu J, Wang Q, Wang S, Cao Y, et al. Embryo-uterine cross-talk during implantation: the role of Wnt signaling. *Mol Hum Reprod*. 2009;15(4):215–21.
170. Mohamed OA, Jonnaert M, Labelle-Dumais C, Kuroda K, Clarke HJ, Dufort D. Uterine Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is required for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(24):8579–84.
171. Tepekoy F, Akkoyunlu G, Demir R. The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(3):337–46.
172. Pollheimer J, Loregger T, Sonderegger S, Saleh L, Bauer S, Bilban M, et al. Activation of the canonical wingless/T-cell factor signaling pathway promotes invasive differentiation of human trophoblast. *Am J Pathol*. 2006;168(4):1134–47.

173. Zhang Y, Zhang Y. Forkhead box C2 promotes the invasion ability of human trophoblast cells through Hedgehog (Hh) signaling pathway. *Cell Biol Int*. 2018;42(7):859–66.
174. 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(3):437–43.
175. Wang G, Zhang Z, Chen C, Zhang Y, Zhang C. Dysfunction of WNT4/WNT5A in deciduas: possible relevance to the pathogenesis of preeclampsia. *J Hypertens*. 2016;34(4):719–27.
176. Meinhardt G, Haider S, Haslinger P, Proestling K, Fiala C, Pollheimer J, et al. Wnt-dependent T-cell factor-4 controls human extravillous trophoblast motility. *Endocrinology*. 2014;155(5):1908–20.
177. Aoki M, Mieda M, Ikeda T, Hamada Y, Nakamura H, Okamoto H. R-spondin3 is required for mouse placental development. *Dev Biol*. 2007;301(1):218–26.
178. Bao H, Liu D, Xu Y, Sun Y, Mu C, Yu Y, et al. Hyperactivated Wnt- $\beta$ -catenin signaling in the absence of sFRP1 and sFRP5 disrupts trophoblast differentiation through repression of *Ascl2*. *BMC Biol*. 2020;18(1):151.
179. Wang Z, Shu W, Lu MM, Morrisey EE. Wnt7b activates canonical signaling in epithelial and vascular smooth muscle cells through interactions with Fzd1, Fzd10, and LRP5. *Mol Cell Biol*. 2005;25(12):5022–30.
180. Cross JC, Nakano H, Natale DRC, Simmons DG, Watson ED. Branching morphogenesis during development of placental villi. *Differentiation*. 2006;74(7):393–401.
181. Monkley SJ, Delaney SJ, Pennisi DJ, Christiansen JH, Wainwright BJ. Targeted disruption of the *Wnt2* gene results in placentation defects. *Development*. 1996;122(11):3343–53.
182. Arango NA, Szotek PP, Manganaro TF, Oliva E, Donahoe PK, Teixeira J. Conditional deletion of  $\beta$ -catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. *Dev Biol*. 2005;288(1):276–83.

183. Mericskay M, Kitajewski J, Sassoon D. *Wnt5a* is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development*. 2004;131(9):2061–72.
184. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev*. 2008;22(18):2454–72.
185. Marigo V, Tabin CJ. Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(18):9346–51.
186. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. 2001;15(23):3059–87.
187. Muenke M, Beachy PA. Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly. *Curr Opin Genet Dev*. 2000;10(3):262–9.
188. Mak KK, Bi Y, Wan C, Chuang PT, Clemens T, Young M, et al. Hedgehog signaling in mature osteoblasts regulates bone formation and resorption by controlling PTHrP and RANKL expression. *Dev Cell*. 2008;14(5):674–88.
189. Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol*. 1996;6(3):298–304.
190. Wijgerde M, Ooms M, Hoogerbrugge JW, Grootegoed JA. Hedgehog Signaling in Mouse Ovary: Indian Hedgehog and Desert Hedgehog from Granulosa Cells Induce Target Gene Expression in Developing Theca Cells. *Endocrinology*. 2005;146(8):3558–66.
191. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci*. 2018;18(1):8–20.
192. Bailey JM, Mohr AM, Hollingsworth MA. Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene*. 2009;28(40):3513–25.



193. Kimura H, Ng JMY, Curran T. Transient inhibition of the Hedgehog pathway in young mice causes permanent defects in bone structure. *Cancer Cell*. 2008;13(3):249–60.
194. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*. 2003;422(6929):313–7.
195. Briscoe J, Ericson J. Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol*. 2001;11(1):43–9.
196. Colnot C, de la Fuente L, Huang S, Hu D, Lu C, St-Jacques B, i sur. Indian hedgehog synchronizes skeletal angiogenesis and perichondrial maturation with cartilage development. *Development*. 2005;132(5):1057–67.
197. van den Brink GR. Hedgehog Signaling in Development and Homeostasis of the Gastrointestinal Tract. *Physiol Rev*. 2007;87(4):1343–75.
198. Pola R, Ling LE, Silver M, Corbley MJ, Kearney M, Blake Pepinsky R, i sur. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med*. 2001;7(6):706–11.
199. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, i sur. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*. 1996;383(6599):407–13.
200. Astorga J, Carlsson P. Hedgehog induction of murine vasculogenesis is mediated by *Foxf1* and *Bmp4*. *Development*. 2007;134(20):3753–61.
201. Carpenter D, Stone DM, Brush J, Ryan A, Armanini M, Frantz G, i sur. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(23):13630–4.
202. Rahnema F, Shafiei F, Gluckman PD, Mitchell MD, Lobie PE. Epigenetic regulation of human trophoblastic cell migration and invasion. *Endocrinology*. 2006;147(11):5275–83.

203. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich L v, Bare JW, Bonifas JM, i sur. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*. 1996;272(5268):1668–71.
204. He M, Subramanian R, Bangs F, Omelchenko T, Liem Jr KF, Kapoor TM, i sur. The kinesin-4 protein Kif7 regulates mammalian Hedgehog signalling by organizing the cilium tip compartment. *Nat Cell Biol*. 2014;16(7):663–72.
205. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, i sur. Identification of an Amplified, Highly Expressed Gene in a Human Glioma. *Science* (1979). 1987;236(4797):70–3.
206. Regl G, Neill GW, Eichberger T, Kasper M, Ikram MS, Koller J, i sur. Human GLI2 and GLI1 are part of a positive feedback mechanism in Basal Cell Carcinoma. *Oncogene*. 2002;21(36):5529–39.
207. Niewiadomski P, Niedziółka SM, Markiewicz Ł, Uśpieński T, Baran B, Chojnowska K. Gli Proteins: Regulation in Development and Cancer. *Cells*. 2019;8(2):147
208. Pr at T. Characterization of Suppressor of fused, a complete suppressor of the fused segment polarity gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1992;132(3):725–36.
209. Delattre M, Briand S, Paces-Fessy M, Blanchet-Tournier MF. The Suppressor of fused gene, involved in Hedgehog signal transduction in *Drosophila*, is conserved in mammals. *Dev Genes Evol*. 1999;209(5):294–300.
210. Zhang Y, Fu L, Qi X, Zhang Z, Xia Y, Jia J, i sur. Structural insight into the mutual recognition and regulation between Suppressor of Fused and Gli/Ci. *Nat Commun*. 2013;4:2608.
211. Cooper AF, Yu KP, Brueckner M, Brailey LL, Johnson L, McGrath JM, i sur. Cardiac and CNS defects in a mouse with targeted disruption of suppressor of fused. *Development*. 2005;132(19):4407–17.

212. Koudijs MJ, den Broeder MJ, Keijser A, Wienholds E, Houwing S, van Rooijen EMHC, i sur. The zebrafish mutants dre, uki, and lep encode negative regulators of the hedgehog signaling pathway. *PLoS Genet.* 2005;1(2):e19.
213. Svärd J, Heby-Henricson K, Persson-Lek M, Rozell B, Lauth M, Bergström A, i sur. Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev Cell.* 2006;10(2):187–97.
214. Humke EW, Dorn K v, Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev.* 2010;24(7):670–82.
215. Yue S, Chen Y, Cheng SY. Hedgehog signaling promotes the degradation of tumor suppressor Sufu through the ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene.* 2009;28(4):492–9.
216. Meng X, Poon R, Zhang X, Cheah A, Ding Q, Hui C chung, i sur. Suppressor of Fused Negatively Regulates  $\beta$ -Catenin Signaling. *Journal of Biological Chemistry.* 2001;276(43):40113–9.
217. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, i sur. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97–109.
218. Brugières L, Pierron G, Chompret A, Paillerets BB de, di Rocco F, Varlet P, i sur. Incomplete penetrance of the predisposition to medulloblastoma associated with germline SUFU mutations. *J Med Genet.* 2010;47(2):142–4.
219. Lee DY, Deng Z, Wang CH, Yang BB. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(51):20350–5.
220. Zerr P, Palumbo-Zerr K, Distler A, Tomeik M, Vollath S, Munoz LE, i sur. Inhibition of hedgehog signaling for the treatment of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2012;120(14):2909–17.

221. Bari R, Hartford C, Chan WK, Vong Q, Li Y, Gan K, i sur. Genome-wide single-nucleotide polymorphism analysis revealed SUFU suppression of acute graft-versus-host disease through downregulation of HLA-DR expression in recipient dendritic cells. *Sci Rep.* 2015;5:11098.
222. Lee Y, Kawagoe R, Sasai K, Li Y, Russell HR, Curran T, i sur. Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis. *Oncogene.* 2007;26(44):6442–7.
223. Robbins DJ, Fei DL, Riobo NA. The Hedgehog Signal Transduction Network. *Sci Signal.* 2012;5(246):re6.
224. Teperino R, Aberger F, Esterbauer H, Riobo N, Pospisilik JA. Canonical and non-canonical Hedgehog signalling and the control of metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;33:81–92.
225. Babcock DT, Shi S, Jo J, Shaw M, Gutstein HB, Gallo MJ. Hedgehog signaling regulates nociceptive sensitization. *Curr Biol.* 2011;21(18):1525–33.
226. Plotnikova O v., Golemis EA, Pugacheva EN. Cell Cycle–Dependent Ciliogenesis and Cancer. *Cancer Res.* 2008;68(7):2058–61.
227. Li JB, Gerdes JM, Haycraft CJ, Fan Y, Teslovich TM, May-Simera H, i sur. Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell.* 2004;117(4):541–52.
228. Vierkotten J, Dildrop R, Peters T, Wang B, Rütther U. Ftm is a novel basal body protein of cilia involved in Shh signalling. *Development.* 2007;134(14):2569–77.
229. Pan J, Wang Q, Snell WJ. Cilium-generated signaling and cilia-related disorders. *Lab Invest.* 2005;85(4):452–63.
230. Deneff N, Neubüser D, Perez L, Cohen SM. Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened. *Cell.* 2000;102(4):521–31.

231. Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet.* 2010;11(5):331–44.
232. Ryan KE, Chiang C. Hedgehog Secretion and Signal Transduction in Vertebrates. *Journal of Biological Chemistry.* 2012;287(22):17905–13.
233. Pietrobono S, Gagliardi S, Stecca B. Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Activation of GLI Transcription Factors Beyond Smoothed. *Front Genet.* 2019;10:556.
234. van den Brink GR, Bleuming SA, Hardwick JCH, Schepman BL, Offerhaus GJ, Keller JJ, i sur. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat Genet.* 2004;36(3):277–82.
235. Mullor JL, Dahmane N, Sun T, i Altaba AR. Wnt signals are targets and mediators of Gli function. *Current Biology.* 2001;11(10):769–73.
236. Pan Y, Yan L, Chen Q, Wei C, Dai Y, Tong X, i sur. Dysfunction of Shh signaling activates autophagy to inhibit trophoblast motility in recurrent miscarriage. *Exp Mol Med.* 2021;53(1):52–66.
237. Pan YB, Gong Y, Ruan HF, Pan LY, Wu XK, Tang C, i sur. Sonic hedgehog through Gli2 and Gli3 is required for the proper development of placental labyrinth. *Cell Death Dis.* 2015;6(2):e1653–e1653.
238. Harman RM, Cowan RG, Ren Y, Quirk SM. Reduced signaling through the hedgehog pathway in the uterine stroma causes deferred implantation and embryonic loss. *Reproduction.* 2011;141(5):665–74.
239. Signorelli P, Avagliano L, Virgili E, Gagliostro V, Doi P, Braidotti P, i sur. Autophagy in term normal human placentas. *Placenta.* 2011;32(6):482–5.
240. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature.* 2007;447(7143):396–8.
241. Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell.* 1999;99(5):451–4.

242. Maccani MA, Marsit CJ. Epigenetics in the placenta. *Am J Reprod Immunol.* 2009;62(2):78–89.
243. Nelissen ECM, van Montfoort APA, Dumoulin JCM, Evers JLH. Epigenetics and the placenta. *Hum Reprod Update.* 2011;17(3):397–417.
244. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003;349(21):2042–54.
245. Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet.* 2001;38(5):285–303.
246. Razin A, Shemer R. DNA methylation in early development. *Hum Mol Genet.* 1995;4 Spec No:1751–5.
247. Jaenisch R. DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet.* 1997;13(8):323–9.
248. Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, i sur. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(24):13734–8.
249. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol.* 2002;241(1):172–82.
250. Oligny LL. Human molecular embryogenesis: an overview. *Pediatr Dev Pathol.* 2001;4(4):324–43.
251. Vlahović M, Bulić-Jakus F, Jurić-Lekić G, Fucić A, Marić S, Serman D. Changes in the placenta and in the rat embryo caused by the demethylating agent 5-azacytidine. *Int J Dev Biol.* 1999;43(8):843–6.
252. Serman L, Vlahović M, Sijan M, Bulić-Jakus F, Serman A, Sincić N, i sur. The impact of 5-azacytidine on placental weight, glycoprotein pattern and proliferating cell nuclear antigen expression in rat placenta. *Placenta.* 2007;28(8–9):803–11.

253. 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. *PLoS One*. 2012;7(3):e33794.
254. Zhao Y, Gong X, Chen L, Li L, Liang Y, Chen S, i sur. Site-specific methylation of placental HSD11B2 gene promoter is related to intrauterine growth restriction. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(6):734–40.
255. Xiao X, Zhao Y, Jin R, Chen J, Wang X, Baccarelli A, i sur. Fetal growth restriction and methylation of growth-related genes in the placenta. *Epigenomics*. 2016;8(1):33–42.
256. Ferreira JC, Choufani S, Grafodatskaya D, Butcher DT, Zhao C, Chitayat D, i sur. WNT2 promoter methylation in human placenta is associated with low birthweight percentile in the neonate. *Epigenetics*. 2011;6(4):440–9.
257. Banister CE, Koestler DC, Maccani MA, Padbury JF, Houseman EA, Marsit CJ. Infant growth restriction is associated with distinct patterns of DNA methylation in human placentas. *Epigenetics*. 2011;6(7):920–7.
258. Barchitta M, Maugeri A, Quattrocchi A, Agrifoglio O, Agodi A. The Role of miRNAs as Biomarkers for Pregnancy Outcomes: A Comprehensive Review. *Int J Genomics*. 2017;2017:8067972.
259. Chen D bao, Wang W. Human placental microRNAs and preeclampsia. *Biol Reprod*. 2013;88(5):130.
260. Pineles BL, Romero R, Montenegro D, Tarca AL, Han YM, Kim YM, i sur. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(3):261.e1-6.
261. Zhu XM, Han T, Sargent IL, Yin GW, Yao YQ. Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 2009 Jun;200(6):661.e1-7.

262. Kimura AP, Liebhaber SA, Cooke NE. Epigenetic modifications at the human growth hormone locus predict distinct roles for histone acetylation and methylation in placental gene activation. *Mol Endocrinol.* 2004;18(4):1018–32.
263. Morris AC, Beresford GW, Mooney MR, Boss JM. Kinetics of a gamma interferon response: expression and assembly of CIITA promoter IV and inhibition by methylation. *Mol Cell Biol.* 2002;22(13):4781–91.
264. Chuang HC, Chang CW, Chang GD, Yao TP, Chen H. Histone deacetylase 3 binds to and regulates the GCMA transcription factor. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(5):1459–69.
265. Ghavifekr Fakhr M, Farshdousti Hagh M, Shanehbandi D, Baradaran B. DNA Methylation Pattern as Important Epigenetic Criterion in Cancer. *Genet Res Int.* 2013;2013:1–9.
266. Dražančić A, Pevec-Stupar R, Kern J. Fetal growth in Zagreb. *Jugosl Ginekol Perinatol.* 1988;28(1–2):13–20.
267. Rizzardi AE, Johnson AT, Vogel RI, Pambuccian SE, Henriksen J, Skubitz AP, i sur. Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Diagn Pathol.* 2012;7(1):42.
268. Vrsalovic MM, Korac P, Dominis M, Ostojic S, Mannhalter C, Kusec R. T- and B-cell clonality and frequency of human herpes viruses-6, -8 and Epstein Barr virus in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Hematol Oncol.* 2004;22(4):169–77.
269. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
270. Odibo AO, Nelson D, Stamilio DM, Sehdev HM, Macones GA. Advanced maternal age is an independent risk factor for intrauterine growth restriction. *Am J Perinatol.* 2006;23(5):325–8.
271. Palatnik A, de Cicco S, Zhang L, Simpson P, Hibbard J, Egede LE. The Association between Advanced Maternal Age and Diagnosis of Small for Gestational Age. *Am J Perinatol.* 2020;37(1):37–43.



272. Vega J, Sáez G, Smith M, Agurto M, Morris NM. Risk factors for low birth weight and intrauterine growth retardation in Santiago, Chile. *Rev Med Chil.* 1993;121(10):1210–9.
273. Kalinka J, Hanke W, Szymczak W. Risk factors of intrauterine growth retardation: a study of an urban population in Poland. *Cent Eur J Public Health.* 1996;4(3):192–6.
274. Tierney-Gumaer R, Reifsnider E. Risk factors for low birth weight infants of Hispanic, African American, and White women in Bexar County, Texas. *Public Health Nurs.* 2008;25(5):390–400.
275. Yu SH, Mason J, Crum J, Cappa C, Hotchkiss DR. Differential effects of young maternal age on child growth. *Glob Health Action.* 2016;9:31171.
276. Pels A, Derks J, Elvan-Taspinar A, van Drongelen J, de Boer M, Duvekot H, i sur. Maternal Sildenafil vs Placebo in Pregnant Women With Severe Early-Onset Fetal Growth Restriction. *JAMA Netw Open.* 2020;3(6):e205323.
277. Groom KM, McCowan LM, Mackay LK, Lee AC, Gardener G, Unterscheider J, i sur. STRIDER NZAus: a multicentre randomised controlled trial of sildenafil therapy in early-onset fetal growth restriction. *BJOG.* 2019;126(8):997–1006.
278. Pfützenreuter GR, Cavalieri JC, Fragoso AP de O, da Corregio KS, Freitas PF, Trapani A. Factors Associated with Intrapartum Cesarean Section in Women Submitted to Labor Induction. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2019;41(6):363–70.
279. Nadeem L, Munir S, Fu G, Dunk C, Baczyk D, Caniggia I, et al. Nodal signals through activin receptor-like kinase 7 to inhibit trophoblast migration and invasion: implication in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Pathol.* 2011 Mar;178(3):1177–89.
280. Redline RW. Placental pathology: a systematic approach with clinical correlations. *Placenta.* 2008;29 Suppl A:S86-91.
281. Scifres CM, Nelson DM. Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblast cell death. *J Physiol.* 2009;587(Pt 14):3453–8.

282. Sola IM, Serman A, Karin-Kujundzic V, Paic F, Skrtic A, Slatina P, i sur. Dishevelled family proteins (DVL1-3) expression in intrauterine growth restriction (IUGR) placentas. *Bosn J Basic Med Sci.* 2021;21(4):447–53.
283. Julian CG, Wilson MJ, Lopez M, Yamashiro H, Tellez W, Rodriguez A, i sur. Augmented uterine artery blood flow and oxygen delivery protect Andeans from altitude-associated reductions in fetal growth. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296(5):R1564-75.
284. Williams LA, Evans SF, Newnham JP. Prospective cohort study of factors influencing the relative weights of the placenta and the newborn infant. *BMJ.* 1997;314(7098):1864–8.
285. Thompson LP. Effects of chronic hypoxia on fetal coronary responses. *High Alt Med Biol.* 2003;4(2):215–24.
286. Rashid CS, Bansal A, Simmons RA. Oxidative Stress, Intrauterine Growth Restriction, and Developmental Programming of Type 2 Diabetes. *Physiology (Bethesda).* 2018;33(5):348–59.
287. Funato Y, Michiue T, Asashima M, Miki H. The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-beta-catenin signalling through dishevelled. *Nat Cell Biol.* 2006;8(5):501–8.
288. Vikram A, Kim YR, Kumar S, Naqvi A, Hoffman TA, Kumar A, i sur. Canonical Wnt signaling induces vascular endothelial dysfunction via p66Shc-regulated reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(10):2301–9.
289. Bretón-Romero R, Feng B, Holbrook M, Farb MG, Fetterman JL, Linder EA, i sur. Endothelial Dysfunction in Human Diabetes Is Mediated by Wnt5a-JNK Signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(3):561–9.
290. Cooke JP, Losordo DW. Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation.* 2002;105(18):2133–5.

291. Caricasole A, Copani A, Caraci F, Aronica E, Rozemuller AJ, Caruso A, i sur. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J Neurosci*. 2004;24(26):6021–7.
292. Alvarez AR, Godoy JA, Mullendorff K, Olivares GH, Bronfman M, Inestrosa NC. Wnt-3a overcomes beta-amyloid toxicity in rat hippocampal neurons. *Exp Cell Res*. 2004;297(1):186–96.
293. Wu Q, Wu G, Li JX. Effect of hypoxia on expression of placental trophoblast cells SATB1 and  $\beta$ -catenin and its correlation with the pathogenesis of preeclampsia. *Asian Pac J Trop Med*. 2016;9(6):567–71.
294. Liu J, Heydeck W, Zeng H, Liu A. Dual function of suppressor of fused in Hh pathway activation and mouse spinal cord patterning. *Dev Biol*. 2012;362(2):141–53.
295. Tariki M, Wieczorek SA, Schneider P, Bänfer S, Veitinger S, Jacob R, i sur. RIO kinase 3 acts as a SUFU-dependent positive regulator of Hedgehog signaling. *Cell Signal*. 2013;25(12):2668–75.
296. Fu G, Brkić J, Hayder H, Peng C. MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications. *Int J Mol Sci*. 2013;14(3):5519–44.
297. Higashijima A, Miura K, Mishima H, Kinoshita A, Jo O, Abe S, i sur. Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy. *Prenat Diagn*. 2013;33(3):214–22.
298. Donker RB, Mouillet JF, Nelson DM, Sadovsky Y. The expression of Argonaute2 and related microRNA biogenesis proteins in normal and hypoxic trophoblasts. *Mol Hum Reprod*. 2007;13(4):273–9.
299. Peng Y, Qin Y, Zhang X, Deng S, Yuan Y, Feng X, i sur. MiRNA-20b/SUFU/Wnt axis accelerates gastric cancer cell proliferation, migration and EMT. *Heliyon*. 2021;7(4):e06695.

300. Peng Y, Zhang X, Ma Q, Yan R, Qin Y, Zhao Y, i sur. MiRNA-194 activates the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in gastric cancer by targeting the negative Wnt regulator, SUFU. *Cancer Lett.* 2017;385:117–27.
301. Alimirah F, Peng X, Gupta A, Yuan L, Welsh J, Cleary M, i sur. Crosstalk between the vitamin D receptor (VDR) and miR-214 in regulating SuFu, a hedgehog pathway inhibitor in breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 2016;349(1):15–22.
302. Park M, Kim M, Hwang D, Park M, Kim WK, Kim SK, i sur. Characterization of gene expression and activated signaling pathways in solid-pseudopapillary neoplasm of pancreas. *Mod Pathol.* 2014;27(4):580–93.
303. Long H, Wang Z, Chen J, Xiang T, Li Q, Diao X, i sur. microRNA-214 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in lung adenocarcinoma by targeting the suppressor-of-fused protein (Sufu). *Oncotarget.* 2015;6(36):38705–18.
304. Ma L, Yang X, Wei R, Ye T, Zhou JK, Wen M, i sur. MicroRNA-214 promotes hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by suppressing Sufu expression. *Cell Death Dis.* 2018;9(7):718.
305. He S, Yang F, Yang M, An W, Maguire EM, Chen Q, i sur. miR-214-3p-Sufu-GLI1 is a novel regulatory axis controlling inflammatory smooth muscle cell differentiation from stem cells and neointimal hyperplasia. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):465.
306. Tupone MG, D'Aguanno S, di Martile M, Valentini E, Desideri M, Triscioglio D, i sur. microRNA-378a-5p is a novel positive regulator of melanoma progression. *Oncogenesis.* 2020;9(2):22.

## 11. ŽIVOTOPIS AUTORA

Ida Marija Šola je rođena u Zagrebu, 15.08.1986. Osnovnu školu završila je u Krškom (Slovenija) te dobila slovensku državnu stipendiju za darovite, Žiga Zois, nakon čega je pohađala Privatnu klasičnu gimnaziju u Zagrebu. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2011. te iste godine dobila Dekanovu nagradu za znanstveni rad „Određivanje stupnja proliferacije trofoblasta i decidua stanica u posteljici štakora“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Ljiljane Šerman. Pripravnički staž odradila je u HZJZ Krapinsko-zagorske županije te 2012. položila stručni ispit. Do 06/2014. radi kao liječnik hitne medicine u Zavodu za hitnu medicinu Koprivničko-križevačke županije. Specijalistički ispit iz ginekologije i opstetricije polaže 12/2019. te je zaposlena u Klinici za ženske bolesti i porodništvo, KBC Sestre Milosrdnice, Zagreb. Subspecijalističko usavršavanje iz područja ginekološke endokrinologije i humane reprodukcije započinje u 12/2021. Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2016. te počinje s izradom disertacije uz potporu Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu, u sklopu EU projekta „Reproduktivna i regenerativna medicina - istraživanje novih platformi i potencijala“. Od 2018. tajnik je Društva za psihosomatiku u ginekologiji i porodništvu pri HLZ-u. Od 2021. vanjski je suradnik na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na predmetu Temelji liječničkog umijeća. Aktivno se služi slovenskim, španjolskim i engleskim jezikom. Redovito sudjeluje na stručnim skupovima iz područja ginekologije i opstetricije te je koautor šest znanstvenih radova u časopisima s međunarodnom recenzijom, poglavlja u dvije stručne knjige te više međunarodnih kongresnih priopćenja.