



**Središnja medicinska knjižnica**

**Blajić, Jozo (2007) *Čimbenici angiogeneze placente u zdravih i dijabetičnih trudnica.*  
Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/342>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Jozo Blajić**

**Čimbenici angiogeneze placente u  
zdravih i dijabetičnih trudnica**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2007.

Disertacija je izrađena u Referalnom centru za dijabetes u trudnoći Ministarstva zdravstva i socijalne skrbe Republike Hrvatske, Klinike za ženske bolesti i porode KBC Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Josip Đelmiš.

Disertaciju posvećujem i zahvaljujem: mentoru prof.dr.sc.Josipu Đelmišu i svojim najbližima.

## **SADRŽAJ:**

<b>1.</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>RAZVOJ POSTELJICE</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1.</b>	<b>Stvaranje blastociste i diferencijacija trofoblasta</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2.</b>	<b>Adhezija blastociste uz deciduu</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3.</b>	<b>Invazija trofoblasta</b>	<b>4</b>
<b>1.1.4.</b>	<b>Vaskularna morfogeneza</b>	<b>17</b>
<b>1.2.</b>	<b>ČIMBENICI RAZVOJA POSTELJICE</b>	<b>18</b>
<b>1.2.1.</b>	<b>Vaskularni endotelijalni faktori rasta (VEGF) i njihovi receptori</b>	<b>20</b>
<b>1.2.2.</b>	<b>Placentarni faktor rasta (PIGF)</b>	<b>26</b>
<b>1.2.3.</b>	<b>Inzulinu slični faktori rasta (IGF)</b>	<b>29</b>
<b>1.3.</b>	<b>ŠEĆERNA BOLEST I TRUDNOĆA</b>	<b>34</b>
<b>2.</b>	<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	<b>39</b>
<b>3.</b>	<b>ISPITANICE I NAČIN ISTRAŽIVANJA</b>	<b>40</b>
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA</b>	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	<b>66</b>
<b>7.</b>	<b>SAŽETAK</b>	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>70</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>72</b>
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b>	<b>90</b>

## 1. UVOD

Jedna od osnovnih karakteristika sisavaca je uspostavljanje intimne veze majke i fetusa posredstvom posteljice - privremenog organa izgrađenog od tkiva oba organizma, koji fetusu zamjenjuje funkciju pluća, bubrega i jetre, tijekom razvoja u organizmu majke.

Prateći evoluciju sisavaca, od malih, glodarima sličnih bića s kratkim razdobljima trudnoće do velikih životinja s produženom trudnoćom, posteljica se prilagođavala sve većim funkcionalnim zahtjevima fetusa, promjenom morfogenetskih i morfoloških karakteristika svojih osnovnih funkcionalnih jedinica - korionskih resica. Specifičnosti razvoja i građe korionskih resica su omogućile uspostavljanje velike površine kontakta između cirkulacija majke i ploda, kao i čitavog spektra specijaliziranih metaboličkih, hormonskih i imunoloških funkcija važnih za uspješan ishod trudnoće(1). Dinamičnost je, također, osnovna karakteristika ontogenetskog razvoja posteljice - ona se svojom građom, a time i svojom funkcijom prilagođava potrebama fetusa, koja neprestano raste tijekom intrauterinog razvoja.

Placenta u ljudi je hemo-korijalno-endotelnog tipa, što znači da je endotel fetalnih kapilara u korionskim resicama u indirektnom kontaktu s krvlju majke preko trofoblasta koji prekriva korionske resice. (2).

Osim toga što ju opskrbljuje cirkulacija majke, placenta sadrži krvožilni kompleks koji je u potpunosti fetalan i nastavlja se na krvne žile fetusa. Fetalnoplacentarne krvne žile nalaze se u korionskim resicama koje oplahuje majčina krv, i ova neposredna blizina dopušta učinkovitu izmjenu otopljenih tvari i plinova između majčinske i fetalne cirkulacije, što omogućava razvoj, rast i pregradnju fetoplacentarnih krvnih žila prema potrebi fetusa, no istovremeno ih čini osjetljivima na promjene s obje, i majčinske i fetalne, strane placente. Bilo koja patološka promjena hemodinamskih obilježja majke, svojstava majčinske krvi (poput hipoksije ili hiperglikemije) ili među čimbenicima rasta, uključujući vaskularni endotelni faktor rasta (vascular endothelial growth factor, VEGF), placentni faktor rasta (Placenta growth factor, PIGF), citokine i medijatore upale, može imati neposredan utjecaj na rast, održavanje i funkciju fetoplacentarnih krvnih žila. Štoviše, promjene na fetoplacentarnim krvnim žilama mogu pretskazati ili odražavati promjene krvnih žila fetusa u razvoju.

Diabetes mellitus (DM) dokazano je povezan s ubrzanom mikroangiopatijom (u okviru dijabetičke retinopatije, nefropatije i neuropatije), a ovo pak može biti povezano s kapilarnom hipertenzijom i promjenama u permeabilnosti kapilara. Dijabetični milieu uključuje hipoksiju, hiperglikemiju, povišen vaskularni endotelni čimbenik rasta, slobodne radikale kisika, završne proizvode glikozilacije, citokine i medijatore upale. Za ove se čimbenike zna da oštećuju funkciju endotelne barijere ili da imaju izrazit angiogeni učinak. U stvari, pojačana angiogeneza uobičajeno je obilježje dijabetične vaskulopatije, posebno kod dijabetičnih komplikacija u okviru proliferativne retinopatije (3).

Majčinski dijabetes združen je s povećanjem morbiditeta i mortaliteta tijekom embrionalnog, fetalnog i perinatalnog razdoblja. Među brojnim abnormalnostima cijeli je niz kardiovaskularnih problema koji zahvaćaju potomka dijabetičnih majki. Krvožilni sustav je prvi organski sustav koji se razvija, i njegovo javljanje potiče (stimulira) razvoj drugih organa, i povezano s time, organotipsku diferencijaciju njihovih vlastitih vaskularnih osnova. Jednako tako kao što je diferencijacija organa tijekom embriogeneze potpomognuta fetalnom vaskularnom morfogenezom, tako su placentaran rast i diferencijacija potpomognuti uspostavom fetoplacentarnog krvožilnog sustava. Doista, tijekom cijelog gestacijskog razdoblja, povećane potrebe rastuće fetalne mase povezane su s trajnom prilagodbom strukture i funkcijskog kapaciteta placente i njene fetalne vaskularne osnove.

## **1.1. RAZVOJ POSTELJICE**

Svrha posteljice je da osigura optimalne uvjete za razvoj fetusa. Za to je važan normalan razvoj posteljice. Rast posteljice je reguliran lokalnom produkcijom čimbenika rasta koji djeluju autokrinim i parakrinim mehanizmom u svrhu utjecaja na razne funkcije stanice. Posteljica je tako smještena da na nju djeluju regulatorni čimbenici majke i fetusa.

Fiziološki proces razvoja posteljice uključuje: (1) stvaranje blastociste i diferencijaciju trofoblasta (2) adheziju blastociste uz deciduu, (3) invaziju trofoblasta (4) vaskulogenezu i angiogenezu.

### **1.1.1. Stvaranje blastociste i diferencijacija trofoblasta**

Za pravilno razumijevanje razvoja korionskih resica, važno je pratiti razvoj posteljice od najranijih stupnjeva embrionalnog razvoja.

Mitotskom diobom zigote nastaju blastomere. Do stupnja od četiri ili osam blastomera (morula), blastomere nemaju polarnost (ne postoji razlika u građi i/ili funkciji dijelova stanica). Nakon stupnja od osam stanica, dolazi do uspostavljanja stanične polarnosti tijekom procesa koji je označen kao kompakcija - na blastomerama se formira apikalna površina koja je prekrivena mikrovilima i bazo-lateralna površina na kojoj se uspostavljaju pukotinaste veze (engl. gap junctions) s ekvivalentnim površinama susjednih blastomera, na kojoj je eksprimiran E-kadherin. Kompakcija je prvi korak u morfogenezi i staničnoj diferencijaciji, koja omogućava orijentaciju blastomera jednih prema drugima i prema vanjskoj sredini (1).

Daljnji razvoj blastomera ide u dva smjera: blastomere koje ostaju u kontaktu s vanjskom sredinom (zaostalom zonom pelucidom) su prekursori trofoektodermalnih stanica (kasnije učestvuju u formiranju posteljice i dijela plodovih ovoja), dok blastomere koje se nalaze unutar omotača ovih prethodnih formiraju unutrašnju staničnu masu (kasnije sudjeluju u formiranju tkiva embrija). Trofoektodermalne stanice dobivaju karakteristike epitelnih stanica - postaju spljoštene i povezane su tijesnim vezama (engl. tight junctions) (1). U stadiju embrija od 32 stanice, trofoektodermni sloj počinje izlučivati tekućinu u ekstracelularni prostor, te se formira blastocista (4). Svi navedeni stadiji razvijaju se u lumenu jajovoda, tijekom migracije embrija u kavum maternice, u koji ulazi trećeg do četvrog dana nakon ovulacije.

### **1.1.2. Adhezija blastociste uz deciduu**

Kada blastocista uđe u kavum uterusa, embrionalni pol (unutrašnja stanična masa) se orijentira prema endometriju (proces orijentacije), nakon čega se zona pelucida razgrađuje i odbacuje-proces odbacivanja zone pelucide. S obzirom da se ove rane faze ne mogu posmatrati in vivo u ljudi, još uvijek je nejasno je li se embrij oslobađa zone pelucide prije ili nakon orijentacije. Oslobođanje blastociste od zone pelucide omogućava prianjanje na površinu epitela endometrija (apozicija), uspostavljanje veze između liganada i receptora na površini embrija i epitela endometrija i invaziju endometrija koju čine izuzetno adhezivne i invazivne trofoektodermalne stanice(1).

Temeljni preduvjet normalnog razvoja je potpuna sinhronizacija embrionalnog razvoja s maturacijom endometrija. Za orkestraciju ovog procesa važna je očuvana funkcija hipofize i jajnika majke, jer obrasci hormonske sekrecije ovih žljezda omogućavaju pravovremenu diferencijaciju endometrija. Tijekom najvećeg dijela menstrualnog ciklusa, endometrij se štiti od implantacije, osim kratkog razdoblja koji je označen kao "prozor implantacije". Po definiciji, receptivnost uterusa je razdoblje maturacije endometrija tijekom koga trofoketodermalne stanice blastociste se mogu prikačiti za epitelne stanice endometrija i nakon toga nastaviti invaziju njegove strome. Za ograničenu receptivnost je odgovoran epitel endometrija, jer je odavno pokazano da ablacija epitela materišne šupljine eksperimentalnih životinja omogućava blastocisti da se potpuno implantira (5). Istraživanja su pokazala da se implantacija kod ljudi normalno javlja između 7. i 10 dana nakon ovulacije (dani 21 - 24 menstrualnog ciklusa) (6,7). S razdobljem maksimalne uterusne receptivnosti koincidira pojava prolaznih specijalizacija na membranama sekretornih stanica epitela endometrija koje se nazivaju pinopodije (8). Do sada, još uvijek, nije potpuno razjašnjena molekularna osnova promjena u humanom endometriju koje vode do izražavanja receptivnosti.

### **1.1.3. Invazija trofoblasta**

Invazija trofoblasta se nastavlja sve dok embrij u potpunosti ne bude okružen stromom endometrija, koja se, uslijed brojnih parakrinih signala koje razmjenjuje s embrijem, histološki i funkcionalno mijenja u procesu označenom kao decidualizacija. (9)

### **Decidualizacija**

Decidua je specijalizirani endometrij trudnoće, koji nastaje pod utjecajem progesterona.

U ovisnosti od lokalizacije, razlikuju se sljedeći anatomske dijelovi decidue: 1. decidua basalis, koja se nalazi ispod mjesta implantacije i koja formira maternalnu komponentu posteljice; 2. decidua capsularis; koja kasnije degenerira; i 3. decidua vera, koja oblaže ostatak kavuma uterusa i koja se nalazi u bliskom odnosu s korionom (2).

Strukture decidue koje ulaze u sastav posteljice su: (1) Decidua basalis - dio decidue koji se nalazi ispod mjesta implantacije; (2) Nitabuhov (Nitabuch) fibrinoidni sloj - acelularna zona u decidui basalis koja nastaje kao posljedica fibrinoidne degeneracije na mjestu kontakta invazivnih trofoblasta s deciduom, koja u fiziološkim uvjetima ne izražava bilo kakav utjecaj



na funkciju posteljice; (3) Intervilozni prostor - područje u okviru decidue koje je, prema decidui, obloženo trofoblastnim stanicama (ekstraviloznim citotrofoblastom koji je u kontaktu s deciduom i tzv. perifernim sinciotrofoblastom koji s jedne strane naleže na opisani citotrofoblastni sloj, a sa druge je u direktnom kontaktu s maternalnom krvlju u interviloznom prostoru, u koji se otvaraju arteriole i venski sinusi decidue. Intervilozni prostor je ispunjen krvlju majke, u koju su zaronjene korionske resice.

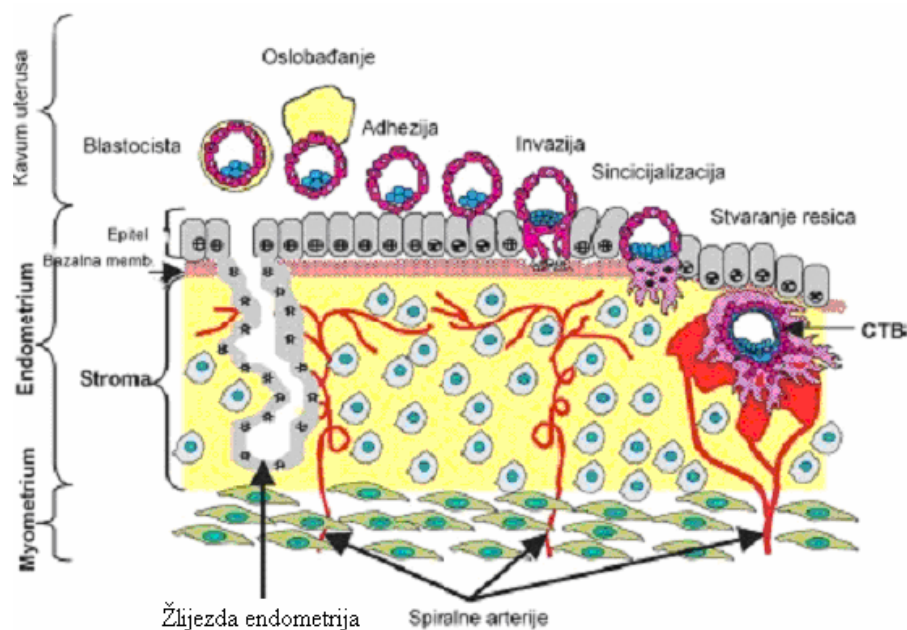
Decidualizacija se posebice vidi u transformaciji stanica endometralne strome koje neposredno okružuju blastocistu. Na samom početku invazije, stanice strome endometrija koje su najbliže blastocisti, prve se transformiraju i oko blastociste stvaraju omotač. Za nekoliko sati, decidualizacija zahvaća čitavu površinu endometrija, mada je ograničena na vanjske 2/3 endometrija (9).

Stanice strome se uvećavaju dobivaju karakteristike stanica koje sintetiziraju lipidne hormone i počinju proizvoditi karakterističnu pericelularnu membranu od kolagena, laminina, fibronektina i heparan sulfat proteoglikana. Pericelularne membrane stanica decidue na taj način formiraju kritičnu barijeru između majke i fetusa. S aspekta organizma majke, decidualizacija je pokušaj limitacije blastocistične invazije. S aspekta organizma fetusa, decidua je barijera koja sprječava imunološko odbacivanje genetski različitog (imunogenog) fetusa. (10). Tijekom decidualizacije dolazi do nakupljanja imunih stanica (većinom velikih granuliranih limfocita - stanica prirodnih ubojica (NK stanice), čija je moguća funkcija sprječavanje prolaska fetalnih antigena u organizam majke (11).

Proces decidualizacije je ovisan o progesteronu i važan je za nastavak trudnoće. Također, decidua je endokrini organ - proizvodi neke hormone (npr., prolaktin i relaksin), kao i veći broj supstanci s parakrinim djelovanjem, koje su značajne za uspostavljanje, održavanje i dovršenje trudnoće.

Implantacija započinje stvaranjem tankih nabora trofoektodermnih stanica (invadopodia), koje vrše invaziju - ulaze između epitelnih stanica endometrija i dosežu do bazalne membrane. Zatim razgrađuju bazalnu membranu i dolaze u kontakt sa stromom endometrija. U ovom stadiju neke od stanica trofoektoderma se fuzioniraju i formiraju sinciotrofoblast, dok druge ostaju zasebne i nazivaju se citotrofoblastnim stanicama. Sinciotrofoblast čini površni, a citotrofoblast unutrašnji sloj trofoektoderma (1). Prema podacima dobivenim in vitro istraživanjima, u ovom stadiju razvoja invazivni potencijal imaju i citotrofoblastne stanice i sinciotrofoblast (12). Kasnije, invazivni potencijal će biti osnovna karakteristika posebnih skupina citotrofoblasta.

Neke stanice citotrofoblasta postaju invazivnije od ostalih, jer se u vidu traka probijaju kroz vanjski sloj sinciciotrofoblasta i čine invaziju decidue, usmjeravaju se prema arteriolama (ne i venulama!) decidue, potpuno ih okružuju, penetriraju, nastavljaju se umnažati u njihovom lumenu sve dok ga ne okludiraju i fenotipski se mijenjaju i zamjenjuju endotelne stanice, izlučuju fibrinoid koji zamjenjuje glatke mišićne stanice i elastična vlakna, stvarajući tako od arteriola rigidne, nekontraktilne cijevi. Na ovaj način se stvara arterijski sustav s malim otporom, koji više nije pod maternalnom vazomotornom kontrolom. Uz to što okludiraju lumen arteriola, citotrofoblasti formiraju zonu sličnu filteru, kroz koju tijekom prvih 8 - 10 tjedana trudnoće prolazi samo serum. Na ovaj način, stanice citotrofoblasta u fazi ranog embrionalnog razvoja služe kao reduktori maternalnog krvnog tlaka (9). Još važnije, okluzija arteriola omogućava razvoj fetusa u sredini u kojoj je parcijalni tlak kisika manji u odnosu na tkiva majke. Oba navedena čimbenika (relativno visoke vrijednosti krvnog tlaka i visok parcijalni tlak kisika u krvi majke) negativno utječu na rani razvoj fetusa (13).



**Slika 1. Stadiji implantacije humane blastociste**

Unutar proliferiranog sinciciotrofoblastnog sloja stvaraju se šupljine (lakune), koje se postupno spajaju i formiraju intervilozni prostor. Intervilozni prostor se širi, obuhvaća stupiće citotrofoblasta koji invadiraju arteriole i/ili koji su povezani - zakačeni za određene dijelove decidue (tzv. trabekule). Vremenom, kako sinciciotrofoblast ostaje samo na korionskim resicama, stanice citotrofoblasta koje nisu u sastavu resica proliferiraju i u potpunosti oblažu

intervilozni prostor (14). Opisani razvoj se odnosi na razdoblje do oko 13. dana nakon koncepcije.

### **Osobine trofoblasta**

Pojam "trofoblast" je uveo Holanđanin A. A. W. Hubrecht, još 1899. godine, označivši stanice blastociste koje ne sudjeluju u formiranju embrija, ali su od ključnog značenja za njegovu prehranu (15).

Osnovne karakteristike ovih stanica su invazivnost, kapacitet za ogromni transcelularni transport tvari i endokrina funkcija (9).

Invazivnost omogućava: adhezivnost i implantaciju embrija, a kasnije, kada dođe do erozije i izmjene stijenke arteriola uterusa, dotok hranljivih i izbacivanje štetnih sastojaka iz organizma embrija. Invazivnost trofoblasta je identična invazivnosti metastatskih malignih stanica. Jedina razlika između ovih vrsta stanica je postojanje mehanizama kojima organizam majke ograničava invazivnost trofoblasta samo na funkcionalni dio decidue i spoj spiralnih i radijalnih arterija uterusa, koji se nalazi na dodiru srednje i unutrašnje trećine miometrija.

Morfološke i funkcionalne karakteristike trofoblasta omogućavaju promet brojnih supstanci kroz njegove stanice u ogromnom opsegu, što omogućava razmjenu tvari između majke i fetusa.

Također, određene linije trofoblasta proizvode brojne hormone i parakrine čimbenike koji su važni za održavanje trudnoće i prilagođavanje organizma majke povišenim funkcionalnim zahtjevima tijekom trudnoće.

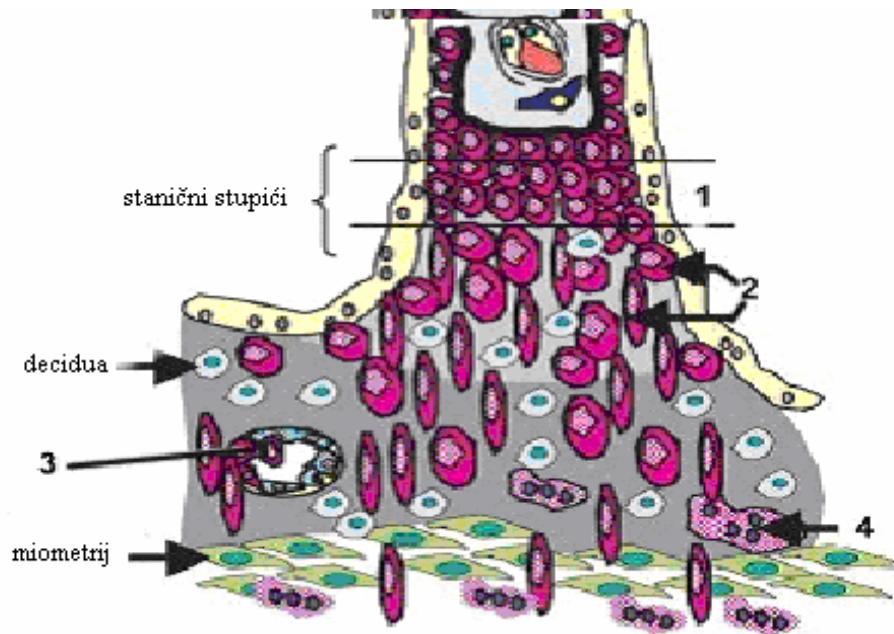
### **Vrste trofoblasta**

Stanice trofoektoderma - trofoblasti već u stadiju blastociste (4. dan nakon koncepcije) su izdvojena stanična linija koja više nema sposobnost stvaranja tkiva samog embrija. Ove stanice su predodređene biti temeljne stanične funkcionalne jedinice posteljice. Matična trofoblastna stanica je vilozni citotrofoblast (vCTB). vCTB je nepokretna, polarizirana matična epitelna stanica. Daljnja diferencijacija vCTB je dihotomna i obuhvaća: (a) fuzijski put diferencijacije, koji se još naziva i vilozni put; i (b) invazivni put diferencijacije, koji je još označen kao ekstravilozni (1).

Proces tijekom koga se stanice vCTB fuzioniraju, pri čemu nastaje sinciciotrofblast, naziva se sincicijalizacija. Detalji mehanizma fuzije stanica vCTB još uvijek nisu u potpunosti poznati, ali nedavna istraživanja su dala podatke koja djelimično objašnjavaju problem. Jedan niz istraživanja je pokazao da se tijekom diferencijacije koja vode fuziji i nastanku sincicija (konkretno, tijekom promjena na citoplazmi vCTB) aktivira isti molekularni put koji je opisan u početnim stadijima apoptoze (16). Dvije nezavisne studije su pokazale da humani sinciciotrofblast eksprimira gen koji kodira protein omotača defektnog endogenog humanog retrovirusa označenog kao HERV-W (17,18). Proizvod spomenutog gena je glikoprotein koji se naziva sincicin. In vitro istraživanja pokazuju kada se sincicin ubaci u ne-trofoblastne stanice, dolazi do indukcije fuzije susjednih stanica. Također, genetska manipulacija kojom se inhibira ekspresija HERV-W genoma dovodi do inhibicije stvaranja STB i do inhibicije sekrecije hCG (19).

Sinciciotrofblast je stanični sloj izuzetnih osobina. U terminu, njegova površina iznosi prosječno oko  $10 \text{ m}^2$ , granice između stanica od kojih je nastao (vCTB) ne postoje, već se jezgre slobodno kreću unutar sincicija. Vjerojatno u cilju povećanja transportne površine, sincicij je gusto prekriven mikrovilima (Benirschke). Ovaj sloj proizvodi praktično sve hormone i većinu enzima posteljice. Na njemu se nalaze brojni receptori i on služi kao osnovni transportni organ za hranjive tvari koje su neophodne plodu, kao i za proizvode metabolizma koji se iz ploda eliminiraju.

Ekstravilozni citotrofoblasti (evCTB) su pokretne nepolarizirane stanice čija je osnovna funkcija invazija maternalnih tkiva; ove stanice ne sudjeluju u sintezi hormona (mada vrše sekreciju određenih supstanci) ili u transportu tvari kroz posteljicu. Najpoznatiji sekretorni proizvod evCTB je protein označen kao "glavni osnovni protein", čija koncentracija konstantno raste u plazmi majke tijekom trudnoće, ali čija uloga nije poznata (9). evCTB imaju izraženu sposobnost fenotipskog kopiranja - prilagođavanja svog izgleda sredini u kojoj se nalaze. Zbog ove osobine, evCTB se naziva i stanicom - kameleonom. Proces fenotipskog kopiranja će biti jasniji nakon opisa osnovnih skupina evCTB.



**Slika 2. Različite vrste citotrofoblata.** (1) CTB u sastavu staničnih stupića; (2) Intersticijalni CTB; (3) Endovaskularni CTB; (4) Orijaške multinuklearne stanice

Postoje tri osnovne skupine evCTB: (1) CTB koji grade stanične stupić (ccCTB), (2) intersticijalni CTB (inCTB) i (3) endovaskularni CTB (enCTB). Imena ovih staničnih skupina proizilaze iz njihove lokalizacije, a samim tim i funkcije.

ccCTB izgrađuju stanične trake preko kojih regija pojedinih korionskih resica uspostavlja vezu sa staničnim i vanstaničnim dijelovima decidue i proksimalne trećine miometrija, čime se uspostavlja fizički oslonac («usidravanje») ploda za majku.

inCTB su stanice koje fenotipski podsećaju na fibroblaste endometrija (fenotipsko kopiranje), nalaze se rasute u intersticiju decidue i stvaraju omotače oko arteriola decidue. Orijaške stanice koje se mogu naći u decidui su mali sinciji koji vjerojatno nastaju fuzijom intersticijalnih citotrofoblata. Njihova funkcija nije objašnjena (1).

Kada penetriraju stijenke arteriola, inCTB se transformiraju u stanice koje su slične endotelnim stanicama (endovaskularni CTB). enCTB vrši intraluminalnu retrogradnu invaziju i intersticijalnu invaziju i destrukciju stijenke arteriole (20).

Intermedijarni trofoblast koji invadira deciduu i miometrij na mjestu implantacije je odgovoran za ogromne fiziološke promjene građe spiralnih arteriola, a koje su od osnovne važnosti za povećanje dotoka krvi na mjesto implantacije. U ranim tjednima trudnoće, on izvada invadira decidualne dijelove spiralnih arteriola. Isprva su slojevi stijenke arteriola zamijenjeni trofoblastičnim stanicama, koje stvarajući fibrinoidni materijal građen od

kompleksa fibrina, sastavnica plazme i bjelančevinske tvari, zamjenjuje endotel te mišićno i elastično tkivo medije žila. Između 14 i 20 tjedana trudnoće, intermedijarni trofoblast se širi iz decidualnih dijelova u miometralne dijelove tijekom spiralnih arteriola te ih na jednak način preoblikuje. Istovremeno s prodorom intermedijarnog trofoblasta u miometralne dijelove spiralnih arteriola, dolazi do prodora endovaskularnog trofoblasta u lumene tih žila invadirajući endotel i mišićni sloj i s unutarnje strane i istovremeno stvarajući rahle intravaskularne čepove, koji u početku trudnoće sprječavaju nagli prodor krvi u tek stvorene intervilozne prostore.

Ovim zbivanjem spiralne arteriole se šire, da bi konačno postale pasivne cijevi koje ne mogu mijenjati svoj promjer, a time ni protok krvi koji se povećava od 100 ml/min prije trudnoće do 500 ml/min u vrijeme termina.

### **Regulacija proliferacije i diferencijacije trofoblasta**

Kao i eritrociti, CTB ima sposobnost detektiranja razine kisika posredstvom proteina s hemom. In vitro istraživanja pokazuju da humani citotrofoblast prolifera u uvjetima hipoksije koji se mogu usporediti s uvjetima koji su u posteljici tijekom rane trudnoće (2% O<sub>2</sub>). U uvjetima dobre oksigenacije, koji podsjećaju na uvjete u tkivu uterusa, CTB se diferencira u invazivne stanice koje podsjećaju na stanice tumora (1).

Kisik je moćan, ali ne i jedini regulator trofoblastne diferencijacije. Diferencijacija CTB je također modulirana citokinima i čimbenicima rasta porijeklom iz endometrija (parakrina regulacija), kao i čimbenicima koji su porijeklom iz samog trofoblasta (autokrina regulacija). Ove činjenice su dovoljne da objasne vremenska (prvi trimestar trudnoće) i topografska ograničenja (decidua i proksimalni dio miometrija) trofoblastne invazije (21).

Stvaranje korionskih resica započinje oko 13. dana nakon koncepcije. U okviru sinciotrofoblasta nastaju lakune, koje svojim spajanjem formiraju intervilozni prostor. Citotrofoblasti prolifiraju i stvaraju trabekule - kompaktne stupiće koji se protežu kroz intervilozni prostor do struktura u sastavu decidue. Ove stanice okružuju i invadiraju arteriole decidue (inCTB) i oblažu njihov lumen (enCTB). U ovo vrijeme, krv još uvijek ne ispunjava intervilozni prostor (lumen arteriola okludiran čepovima od enCTB), već ultrafiltrat maternalne plazme (za nesmetani tijek ranog embrionalnog razvoja je neophodna sredina s malim parcijalnim tlakom kisika). Maternalna krv počinje cirkulirati kroz intervilozni prostor nakon 10. tjedna od koncepcije (9).

Prstolike formacije sastavljene od proliferiranih citotrofoblasta izrastaju iz trabekula pružajući se lateralno od njih u intervalozni prostor. Sve dok su ovi izraštaji sastavljeni isključivo od trofoblasta, po definiciji se označavaju kao primarne korionske resice (villi choriales I) (15). Početkom 5. tjedna (preciznije, oko 21. dana) nakon koncepcije, počinje invazija centralnog dijela primarnih resica od strane ekstraembrionalnog mezenhima. Po definiciji, korionska resica koja je izvana izgrađena od trofoblasta i koja ima avaskularni centralni dio izgrađen od mezenhima naziva se sekundarnom korionskom resicom (villus choralis II) (15). Nakon nekoliko dana, započinje proces de novo stvaranja fetoplacentalnih krvnih žila u mezenhimu sekundarnih resica, koji se označava kao vaskulogeneza (22). Ovaj proces se može pratiti korištenjem imuno-histokemijske detekcije CD34 molekula, koji je marker vaskulogeneze (23). Prve fetoplacentalne kapilare u sastavu sekundarnih korionskih resica se mogu vidjeti u razdoblju između 5. i 6. tjedna nakon koncepcije (24), što po definiciji označava njihovu transformaciju u tercijarne korionske resice (15, 16). Po definiciji, sve generacije vaskulariziranih korionskih resica koje nastaju nakon ovoga, predstavljaju samo podrazrede tercijarnih korionskih resica (25).

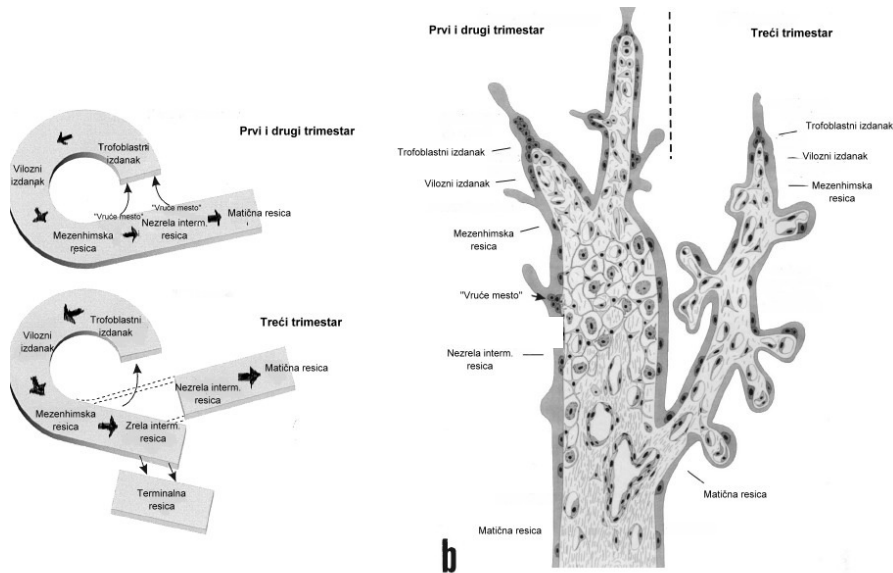
U početnim stadijima razvoja, korionske resice prekrivaju čitavu površinu koriona (chorion frondosum – resičasti korion). Međutim, kako gestacijska vrećica sve više raste i ispupčava se u kavum uterusa, da bi ga konačno potpuno obliterirao, tako nastaje i degeneracija korionskih resica na svim dijelovima koriona, izuzev na dijelu koji je u kontaktu s bazalnom deciduom. Tako se vremenom na korionu mogu razlikovati dva anatomska različita dijela - korion bez resica (chorion laeve – goli korion) i dio koriona koji ulazi u sastav posteljice.

### **Klasifikacija korionskih resica**

Prema histološkoj građi, tercijarne korionske resice se dijele u pet razreda: (1) mezenhimske resice; (2) nezrele intermedijarne resice; (3) matične resice; (4) zrele intermedijarne resice; i (5) terminalne resice (25).

Mezenhimske resice su prva generacija tercijarnih korionskih resica. Nastanak mezenhimnih resica predstavlja morfološki preduvjet efikasne razmjene hranljivih sastojaka, plinova i ekskretornih proizvoda između majke i fetusa. One imaju kompletni trofoblastni omotač sastavljen od citotrofoblasta i sinciciotrofoblasta s pravilnim rasporedom jezgara u citoplazmi. Stroma je obilna, rastresita i nezrela i u njoj se nalaze rijetke Hofbauerove stanice (makrofagi posteljice) i slabo razvijene fetalne kapilare (26). S mezenhimskih resica

pupanjem nastaju trofoblastni izdanci, koji se zatim transformiraju u vilozne izdanke, a ovi konačno u nove mezenhimske izdanke. Mezenhimske resice se vremenom transformiraju u nezrele intermedijarne resice ili zrele intermedijarne resice (nakon 23. tjedna gestacije).



**Slika 3. Shematski prikaz razvoja, diferencijacije i osnovne histološke građe korionskih resica.**



**Slika 4. Elektronska mikrografija vanjske površine trofoblastnih i viloznih izdanaka (izdanci imaju oblik štapića za bubanj) koji polaze s površine nezrele intermedijarne resice.**

Sve korionske resice su tipa mezenhimskih resica do otprilike 5. tjedna nakon koncepcije (26). Nakon toga, dolazi do diferencijacije ovih resica u nezrele intermedijarne resice. Ovaj tip resica se histološki karakterizira dobro očuvanim, kompletnim trofoblastnim omotačem, u kome su posebno brojni citotrofoblasti; jezgre u sinciciju su ravnomjerno raspoređene i ne postoje sincicijski čvorovi ili vaskulo-sincicijalne membrane. Promjer

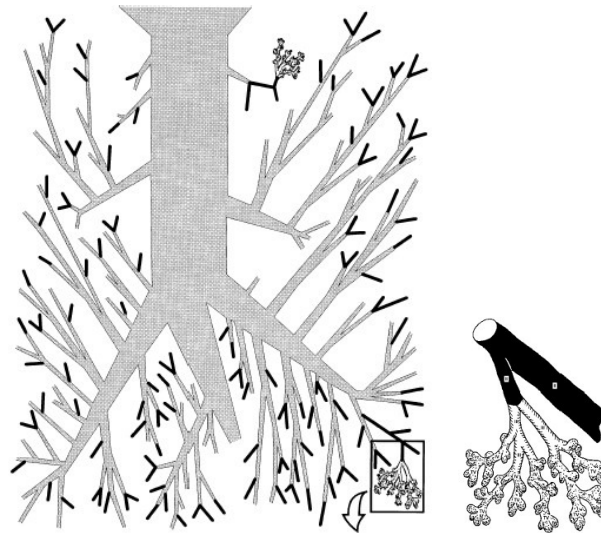


nezrele intermedijerne resice je značajno veći od promjera mezenhimskih resica, stroma je obilna i formira brojne longitudinalno orijentirane trake (27). Hofbauerove stanice su brojne, a nazočne su i dobro razvijene kapilare, arteriole i venule (jasno razvijena adventicija, koja je uronjena u rastresito vezivno tkivo strome). Nezrele intermedijarne resice se, vremenom, diferenciraju u matične resice. (25)

Matične resice nastaju fibrozom strome nezrelih intermedijarnih resica. Sve korionske resice koje sadrže arterije i vene ili arteriole i venule s tunikom medijom i tunikom adventicijom koje su vidljive pod svjetlosnim mikroskopom i s kondenziranom fibrozom stromom koja ispunjava više od polovice stromalnog prostora resice, po definiciji se označavaju kao matične resice (28). Vremenom, fibroza obuhvaća čitavu stromu resice. Sloj sinciotrofoblasta je debeo i ravnomjerno raspoređen s vanjske strane. Pri kraju trudnoće, ovaj sloj često degenerira i zamjenjuje se periviloznim fibrinoidom. Sloj citotrofoblasta je diskontinuiran i ove stanice se nalaze na oko 20% površine resice. Vaskulo-sincicijalne membrane nisu nazočne. U stromi se nalaze izraženi trakama slične kondenzirane nakupine kolagenih vlakana i fibroblasti, miofibroblasti, kao i makrofagi. Adventicija arterija i vena se bez jasne granice nastavlja na gusto fibrozno tkivo strome. Na periferiji, u manje gustoj stromi se mogu naći rijetki ostaci kapilara (29). Na temelju građe matičnih resica, moguće je pouzdano ustvrditi zrelost posteljice - perzistiranje malog pojasa rastresitog vezivnog tkiva ispod trofoblasta (nepotpuna fibroza) i odsustvo periviloznog fibrinoida pouzdano ukazuju na morfološku i funkcionalnu nezrelost posteljice (28).

Osnovna funkcija matičnih resica je da služe kao osnova - skelet koji podržava periferne ogranke stabla korionskih resica. Skoro trećina ukupnog volumena tkiva resica u zreloj posteljici otpada na matične resice (26).

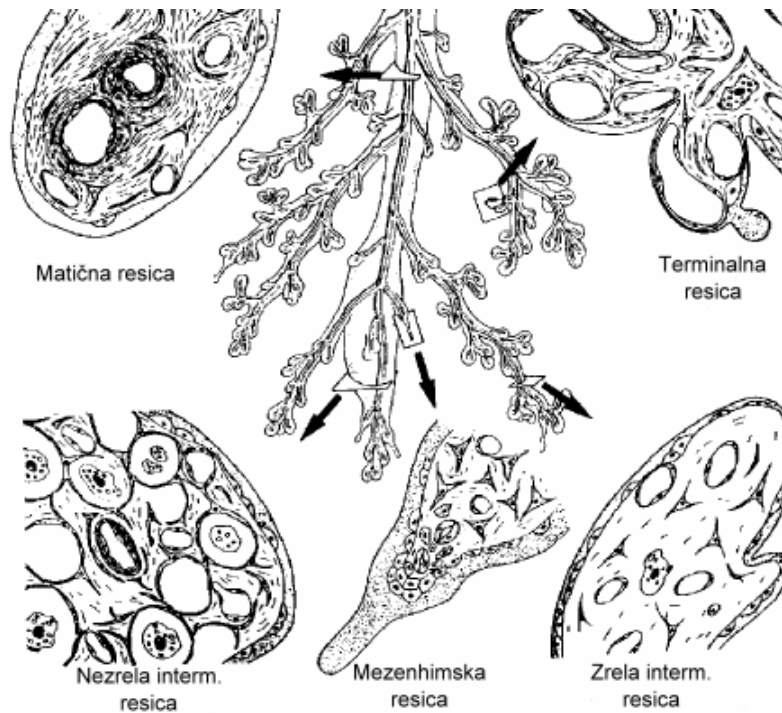
Matične resice i njihovi prekursori (nezrele intermedijarne resice) mogu se selektivno identificirati imuno-histokemijskim tehnikama za detekciju  $\gamma$ -aktina glatko-mišićnih stanica. Na temelju promjera i rasporeda  $\gamma$ -aktina glatko-mišićnih stanica, matične resice mogu se podijeliti u tri razreda. Obrazac grananja, tj. broj terminalnih po jednoj matičnoj resici, ovisi od razreda matične resice. (29)



**Slika 5. Dvodimenzionalna grafička rekonstrukcija grananja korionskih resica u terminu.** Sivi dijelovi predstavljaju matične resice, crni dijelovi zrele intermedijarne resice (ZIR). Uokvirena je zadnja generacija ZIR s terminalnim resicama (detalj prikazan na manjoj slici).

Zrele intermedijarne resice, u odnosu na svoje nezrele analoge, sadrže manju količinu strome u kojoj nema stromalnih longitudinalnih nakupina vezivnih vlakana i imaju manju gustoću citotrofoblasta. Sinciciotrofoblast ima uniformnu strukturu, a sincicijski čvorovi i/ili vaskulo-sincicijalne membrane nisu nazočne. Skoro četvrtina svih resica zrele posteljice pripada ovoj kategoriji (26). Njihova najvažnija razlika u odnosu na nezrele intermedijarne resice je činjenica da se one ne diferenciraju u matične resice.

Kapilare zrelih intermedijarnih resica su izdužene i nisu razgranate, a njihov longitudinalni rast brzo nadmašuje dužinu resice. Posljedica ovoga je lateralno izbočavanje ("prolabiranje") kapilarnih petlji, koje tako postaju okružene samo slojem viloznog trofoblasta i malom količinom strome. Navedeni ogranci zrelih intermedijarnih resica nastaju na čitavoj njihovoj površini i predstavljaju najefikasnije strukture za razmjenu tvari između majke i ploda; nazivaju se terminalnim resicama (30; 28).



**Slika 6. Detalji grananja i histološke građe korionskih resica.**

Terminalne resice Broj terminalnih resica eksponencijalno raste u trećem trimestru trudnoće, a time i površina posteljice preko koje se vrši razmjena tvari. U terminu, ova površina iznosi i do  $13 \text{ m}^2$ , a u njenim kapilarama se u svakom trenutku nalazi oko 80 ml fetalne krvi (25% ukupne količine fetalne krvi) (31). Veličina terminalnih resica nikada ne prelazi  $40 \mu\text{m}$ . Sloj citotrofoblasta je tanak, nepravilan, a na nekim mjestima u potpunosti nedostaje. Sincicij je također tanak i ima znatno manje jezgara (ili se jezgre tu uopće ne nalaze). Mjesta na kojima nedostaje citotrofoblast i na kojima je sinciotrofoblast u bliskom je kontaktu sa stijenkom kapilara resice nazivaju se sincicio-vaskularne membrane (naziv nastao zbog toga što pod običnim mikroskopom izgleda kao da citoplazma sincicija tu i ne postoji). Transfer plinova kroz ova područja je znatno olakšan. Posljedica migracije jezgara sinciotrofoblasta iz područja sincicio-vaskularnih membrana je njihovo nagomilavanje na drugim mjestima, gdje formiraju tzv. sincicijalne čvorove. Ovi čvorovi prominiraju u intervillozne prostore, odakle se nerijetko mogu otkinuti i dospjeti u cirkulaciju majke i embolizirati njezine plućne kapilare (asimptomatska pojava, koja se najčešće slučajno otkriva na histopatološkim pregledima uzoraka plućnog tkiva žena).

## **Poremećaji diferencijacije korionskih resica**

Osnovni mehanizam rasta i razvoja posteljice, koji omogućava ovom organu da prati sve veće zahtjeve rastućeg ploda, je grananje korionskih resica. Početak procesa označava povećana mitotska aktivnost citotrofoblasta na površini nezrele intermedijarne ili mezenhimske resice. Mjesta na kojima se može detektirati povišena mitotska aktivnost su označena kao "vruća mjesta". Proliferacijom trofoblasta na "vrućem mjestu" dolazi do pojave jasno vidljivog pupoljka, sastavljenog isključivo od trofoblasta, koji podsjeća na palicu bubnja i koji se naziva trofoblastni pupoljak. Invazijom strome u trofoblastni pupoljak, on biva transformiran u vilozni pupoljak. Nastankom kapilarne mreže u stromi viloznog pupoljka, nastaje mezenhimska resica, koja se postupno diferencira u nezrelu ili u zrelu intermedijarnu resicu.

U prva dva trimestra trudnoće (sve do početka 23. tjedna nakon koncepcije) mezenhimske resice se diferenciraju u nezrele intermedijarne resice, a ove vremenom u matične resice. U ovom slučaju, idući od perifernih (distalnih) dijelova razgranavajućeg i rastućeg drveta korionskih resica, nailazimo prvo na nove mezenhimske resice, koje se pri svojoj bazi postepeno diferenciraju u nove nezrele intermedijarne resice, a ove se pri svojoj bazi vremenom diferenciraju u matične resice. Posljedica ovakvog razvoja je postojanje oko 10 - 16 generacija granajućih matičnih resica u zreloj terminskoj posteljici (25).

U trećem trimestru trudnoće, počevši od 23. tjedna, a posebno u periodu od 24 - 26 tjedna nakon koncepcije, kada fetus stiče mogućnost da preživi u vanjskoj sredini, u cilju praćenja sve većih funkcionalnih zahtjeva fetusa, u posteljici dolazi do promjene smjera diferencijacije mezenhimske resice, u smislu nastanka zrelih intermedijarnih resica (30).

Kašnjenje promjene smjera diferencijacije mezenhimske u zrele intermedijarne resice može dovesti do predominacije mezenhimske i nezrele intermedijarne resice, do neograničene arborizacije i pojave ekstremno velike nezrele posteljice koja je funkcionalno insuficijentna. Ova pojava se može vidjeti u slučajevima nepodudarnosti Rhesus faktora majke i ploda, praćene senzibilizacijom, i kod intrauterinog zastoja u rastu ploda (28).

U slučaju kada do promjene smjera diferencijacije koji vodi nastanku zrelih intermedijarnih resica dođe prije 23. tjedna trudnoće, nastaje zastoj u arborizaciji praćen prijevremenim sazrevanjem posteljice. Unatoč tome što ima visoko diferencirane resice, takva posteljica je neuobičajeno mala i često nije sposobna osigurati stupanj razmjene tvari koji je potreban za normalan razvoj fetusa. Tipični primjeri stanja u kojima nastaje prijevremena promjena smjera diferencijacije mezenhimske resice su maturitas precox placentae (32), hiper maturitet posteljice (33), kao i trudnoće u kojima postoji intrauterini zastoj u rastu praćen

visokim otporom u umbilikalnim arterijama (34, 35, 36). Navedeni proces često rezultira gubitkom trudnoće ili lošim ishodom u neonatalnom razdoblju.

Placenta u ranim stadijima trudnoće izlučuje brojne angiogene čimbenike. Međutim, trofoblast u kasnijim stadijima razvoja sintetizira velike količine VEGF-receptora (Flt-1) koji inhibira angiogene čimbenike. Pretvaranje spiralnih arterija u uteroplacentarne krvne žile završava sredinom trudnoće, dok angiogeneza u placenti i u fetusu traje tijekom čitave trudnoće. U placentarnoj angiogenezi sudjeluju brojni vaskularni endotelni čimbenici rasta (VEGF) koje uglavnom sintetizira citotrofoblast. Hildebrandt i suradnici (38) su dokazali receptore za ove čimbenike na endotelu krvnih žila, a njihov broj ovisi o razini estrogena.

U prvom i drugom tromjesečju trudnoće placentarne krvne žile nastaju de novo diferencijacijom mezenhimskih stanica u endotelne stanice i u prve krvne stanice (vaskulogeneza). Tijekom trećeg tromjesečja dolazi do pupanja novih krvnih kapilara iz već postojećih krvnih žila (angiogeneza).

Od 22. dana razvoja do 26. tjedna trudnoće razvoja vaskulogenezom nastaju tračci koji se granaju i spoje s krvnim žilama embrionalnog drška. Početni oblici krvnih žila resica nemaju u svojoj stijenci mišićne stanice. Krvne žile placentarnih resica kasnije će se diferencirati u arterije i vene, ovisno o krvnom tlaku i o hemodinamskim uvjetima.

Placentarne krvne žile nisu inervirane pa u regulaciji vazomotorne aktivnosti i vaskularnog tonusa ne sudjeluje živčani sustav. Huidobro-Toro i suradnici (39) su ustanovili da umbilikalne vene i vene placentarnih resica sadržavaju u kružnom sloju medije pacemaker glatke mišićne stanice, međusobno povezane brojnim tijesnim spojevima (gap junction). Ove stanice su odgovorne za ritmičke kontrakcije čitave medije i kontroliraju veličinu protoka fetalne krvi.

#### **1.1.4. Vaskularna morfogeneza**

Ovaj pojam obuhvaća niz procesa koji dovode do uspostave zrele vaskularne mreže. Ovi procesi uključuju:

- 1 Vaskulogenezu (nastajanje krvnih žila iz hemangioblastičnih prekurzorskih stanica);
- 2 Angiogenezu (nastajanje krvnih žila ili segmenata krvnih žila iz postojećih krvnih žila);
- 3 Stvaranje mreže (stvaranje primarnog vaskularnog pleksusa);
- 4 Preoblikovanje mreže i identitet krvnih žila (stvaranje zrele mreže koja sadrži arterije, kapilare i vene).

## 1.2. ČIMBENICI RAZVOJA POSTELJICE

Čimbenici koji sudjeluju u razvoju krvnih žila resica su:

- fibroblastni čimbenici rasta (FGF-1 i FGF-2) koji stimuliraju proliferaciju stanica i invazivnost izvanresičnog citotrofoblasta mijenjajući aktivnost aktivatora plazminogena te djeluju na vazomotornu funkciju povećanjem sinteze dušičnog oksida (NO). U prvom tromjesečju trudnoće nastaju u citotrofoblastu resica i u izvanresičnom invazivnom citotrofoblastu, a FGF-2 i u sinciotrofoblastu. U zreloj placenti FGF-1 nastaje u sinciotrofoblastu, Hofbauerovim stanicama i u glatkim mišićnim stanicama medije većih krvnih žila, a FGF-2 u endotelnim i mišićnim stanicama krvnih žila.
- vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) za čiju je sintezu potrebno aktiviranje gena na kromosomu 6. Mutacija gena odgovornih za stvaranje receptora za VEGF (VEGFR) uzrokuje izostanak vaskulogeneze i hematopoeze u mezodermu zida žumanjčane vreće. Vežanjem za receptor VEGF ima dvostruko djelovanje: stimulira mitozu stanice te aktivira enzim NOS i izlučivanje NO. U prvom tromjesečju trudnoće VEGF nastaje u resicama (u sinciotrofoblastu, u stanicama strome i u endotelu krvnih žila), u decidualnim stanicama i u izvanresičnom citotrofoblastu. U zreloj placenti sintetiziraju ga samo sinciotrofoblast i izvanresični citotrofoblast.
- placentarni čimbenik rasta (PIGF) za čiju je sintezu potrebno aktiviranje gena na kromosomu 14. Tijekom trudnoće koncentracija ovog čimbenika povećava se u majčinoj krvi, a smanjuje u amnijskoj tekućini. PIGF nastaje u sinciotrofoblastu i/ili u citotrofoblastu, u endotelu i u mediji krvnih žila resica te u decidualnim stanicama. Hipoksija uzrokuje porast koncentracije VEGF-a i smanjeno izlučivanje PIGF-a.
- hepatocitni čimbenik rasta (HGF) koji stimulira rast stanica trofoblasta parakrinim djelovanjem. Sintetiziraju ga sinciotrofoblast, perivaskularni miofibroblasti i endotel krvnih žila resica.
- humani angiogenin je polipeptid koji tijekom angiogeneze sudjeluje u proliferaciji i formiranju novih krvnih kapilara. Rajashekhar i suradnici (40) su ga dokazali u resicama već u prvom trojesečju trudnoće, a pred kraj trudnoće njegova je količina dvostruko veća.

Površina posteljice raste usporedno sa širenjem maternice i rastom fetusa.

Placenta služi kao posrednik između majčinog i fetalnog krvotoka, jer se prijenos tvari i plinova vrši kroz placentarnu membranu. Regulacija protoka majčine krvi je složena i ovisi o arterijskom otporu protoku krvi izvan placente. Kolinergička inervacija krvnih žila maternice za vrijeme trudnoće postaje funkcijski važna osobito u drugom tromjesečju trudnoće. Adrenergička vlakna u maternici postepeno nestaju u miometriju pa se njihov broj oko krvnih žila maternice značajno smanji napredovanjem trudnoće. Dokazano je djelovanje brojnih vazoaktivnih čimbenika na uteroplacentarni protok krvi. Potvrđeno je održavanje protoka majčine krvi djelovanjem estrogena iz placente te sintezom prostaglandina odgovornih za vazodilataciju i inhibiciju vazokonstrikcije uzrokovane cirkulirajućim vazoaktivnim hormonima.

O regulaciji fetoplacentarnog protoka krvi zna se mnogo manje. U humanoj placenti i pupkovini do danas nije dokazano postojanje ni kolinergičkih niti adrenergičkih vlakana. Predpostavlja se da je smanjenje protoka majčine krvi kroz placentu povezano sa sintezom fetalnih vazokonstriktora i majčinih vazodilatatora, koji zajedno nastoje održati veličinu perfuzije stalnom.

Vaskulosincicijske membrane predstavljaju dijelove placentarne membrane, građene od stanjene citoplazme sinciciotrofoblasta i endotela krvnih kapilara terminalnih resica. Pojavljuju se na površini terminalnih resica u 32. tjednu kao rezultat različitog intenziteta rasta trofoblasta i krvnih kapilara resica. Krvne kapilare rastu i granaju se i nakon prestanka rasta trofoblasta pa vrše mehanički pritisak na stromu i trofoblast, koji se stanjuje. Neposredno ispod trofoblasta krvne kapilare postaju dilatirane, a u njihovoj dilataciji i formiranju vaskulosincicijske membrane vjerojatno sudjeluju i periciti, stanice u stijenci kapilara koje imaju sposobnost kontrakcije. Pred kraj trudnoće debljina vaskulosincicijske membrane je 1-2 $\mu$ m.

Diferencijacija i razvitak fetoplacentarnih krvnih žila rezultat su vaskulogeneze i angiogeneze, dok je prilagodba spiralnih arterija posljedica angiogeneze (41). Usklađivanje ovih razvojnih procesa pod nadzorom je obitelji lokalno djelujućih angiogenih čimbenika rasta kao što su placentarni (PIGF), vaskularni endotelijalni (VEGF), angiopoetin (Ang-1) i njihovi receptori. Ostali poticajni angiogeni čimbenici identificirani u posteljici su FGF i hepatocitni faktor rasta (HGF), PDGF, IGF, TGF $\alpha$  i  $-\beta$ , IL-8 (1,22,46). Antiangiogena svojstva pokazuju Ang-2, angiostatin, endostatin, interferon  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  i LIF (42).

Ang-1 i VEGF sinergistički stimuliraju angiogenezu. VEGF utječe na proliferaciju fetoplacentarnog krvožilja, a angiopoetini, dominantni u drugoj polovici trudnoće značajni su za organizaciju i stabilizaciju majčinskih endotelinih stanica i pericita. Nedostatak Ang-1

manifestira se kardiovaskularnim oštećenjem i umiranjem u drugoj polovici trudnoće. Primarna funkcija Ang-2 je vaskularna regresija. Najviše ga ima oko desetog tjedna trudnoće u majčinskim endotelnim stanicama (43,44,45). Bazični fibroblastni čimbenik rasta (bFGF) je vjerojatno najznačajniji ovarijalni angiogeni faktor. Izoliran je prvotno iz tumorskih stanica, ali secerniraju ga i trofoblast i endotelne stanice posteljice (46).

Faktori rasta nakon vezanja za odgovarajuće receptore na staničnoj površini započinju staničnu fosforilacijsku kaskadu čiji rezultat je aktivacija mitogenih protein kinaza (47).

### **1.2.1. Vaskularni endotelijalni faktori rasta (VEGF) i njihovi receptori**

VEGF je specifični mitogen za vaskularni endotel jer ostali angiogeni faktori, IGF-I i PDGF npr., potiču i značajnu fibroblastnu proliferaciju (48,49,59). Opisan je sinergistički utjecaj VEGF-a i bFGF-a u angiogenezi (42). In vitro istraživanja dokazuju da će inhibicija bFGF-a, bez obzira na odgovarajuću koncentraciju VEGF-a i njegovih receptora, zbog povećane apoptoze spriječiti angiogenezu (46).

VEGF stabilizira novostvorene kapilare arterijalnog, venskog i limfatičnog porijekla indukcijom antiapoptoičkih proteina Bel-2 i A1 (15,45,42).

Kao faktor vaskularnog permeabiliteta (VPF) VEGF je oko 50000 puta učinkovitiji od histamina (51). Unutar endotela nastaju šupljine kroz koje cure proteini plazme i stvaraju fibrinski gel, podlogu za rast endotelnih i tumorskih stanica izvan krvnih žila (52,49). Ima i pro- i antikoagulantni učinak. VEGF potiče koagulaciju učinkom na tkivni i von Willebrandov faktor u endotelijalnim stanicama i monocitima (53,54). Povećava stvaranje aktivatora plazminogena i metaloproteinaza, važnih u razgradnji izvanstanične tvari, što olakšava angiogenezu. U kontroli procesa sudjeluju inhibitori aktivatora plazminogena također stimulirani VEGF-om, koji smanjuju adheziju i migraciju endotelnih stanica, a povećavaju apoptozu (46).

VEGF potiče kemotaksiju monocita (54). Inhibira sazrijevanje dendritičnih stanica koje u imunološkom sustavu domaćina prepoznaju strane antigene i na taj način olakšava širenje tumora (54). Angiogeneza ovisna o VEGF-u kod enhondralne osifikacije ostvaruje se putem VEGF receptora 1 na osteoblastima (57). Ostali utjecaji VEGF-a na staničnoj razini su povećanje transporta heksoze i mobilizacija intracelularnog kalcija (57).

Pokusima na štakorima nakon intravenozne primjene VEGF-a dokazana je o dozi ovisna vazodilatacija, prolazna tahikardija, hipotenzija i smanjenje srčanog udarnog volumena. Ti učinci su postignuti stimulacijom sinteze NO u endotelu (57). Stvoreni NO



može pozitivnom povratnom spregom povećati ekspresiju VEGF-a i bFGF-a, ali je i negativnom povratnom spregom smanjiti (58).

### **Grada VEGF-A**

Humani gen za VEGF sadži osam eksona (dijelova koji izravno programiraju redosljed aminokiselina), odijeljenih sa sedam introna. Kodna regija obuhvaća oko 14kb na kromosomu 6 (59). Početni je produkt transkripcije preteča glasničke RNA (mRNA), koja je do deset puta veća od konačne mRNA. Tijekom prerade se prijepisi introna isijecaju, a eksoni povezuju i omogućavaju različite načine sastavljanja mRNA. Tako od jedinstvenog gena za VEGF nastane pet različitih molekula VEGF-a koje sadrže po 121, 145, 165, 189 i 206 aminokiselina (60).

Strukturna heterogenost molekula određuje biološku funkciju, jer se razlikuju obzirom na topivost i sposobnost vezanja heparina. Vezanje za heparin produljuje biološku aktivnost VEGF-a, olakšavajući pristup receptorima i vezanje u izvanstaničnoj tvari (61).

VEGF<sub>165</sub>, najčešća i biološki najaktivnija izoforma molekularne težine 45 kDa je bazični, homodimerički sekretorni glikoprotein koji veže heparin. Značajna mu frakcija ostaje vezana za staničnu površinu i u izvanstaničnoj tvari.

VEGF<sub>121</sub> je slabo kiseli topivi polipeptid koji nema sposobnost vezanja heparina (61).

Bazični VEGF<sub>189</sub> i VEGF<sub>206</sub> gotovo su u potpunosti vezani u izvanstaničnoj tvari iz koje ih u topivi oblik pretvara heparin, ili proteaze, uključujući i aktivator plazminogena (61).

VEGF<sub>206</sub> je vrlo rijetka izoforma, jedina koja nije izolirana iz posteljice. Najviše je ima u fetalnoj jetri (51).

Topivi VEGF<sub>145</sub> je identificiran tek nedavno. Zajedno s VEGF<sub>121</sub> i VEGF<sub>165</sub> ima najjači učinak na endotelijalne stanice (51,62).

Studije kod kojih je gen za VEGF inaktiviran dokazale su njegov presudni značaj u embrionalnom razvitku. Inaktivacija samo jednog alela za VEGF rezultira smrću mišjeg embrija oko polovice trudnoće zbog teških razvojnih anomalija srca, velikih krvnih žila i mozga (51, 63,64).

VEGF postoji u većini odraslih i fetalnih tkiva i staničnih kultura. U humanih fetusa gestacijske dobi između 16.-22. tjedna najviše mRNA nađeno je u plućima, bubrezima i slezeni; manje u srcu, nadbubrežnim žlijezdama, gušterači, crijevima, jetri, testisima, koži, mišićima i mozgu, a najmanje u timusu. Ima je u krvi i slini (51,92). Izolirana je i iz mnogih tumorskih tkiva (33,65).

U maternici se mRNA za VEGF nalazi u endometriju i miometriju tijekom menstrualnog ciklusa (51). U trudnoći, mRNA i protein za VEGF dokazani su u decidui (žljezdama, stromi, makrofagima), izvanresičastom i resičastom cito- i sinciciotrofoblastu. U posteljici nađu se i u Hofbauerovim stanicama, endotelnim i stromalnim stanicama resice, te u epitelu amniona i koriona u trećem tromjesečju trudnoće (65,66,67). Neka druga istraživanja upućuju da su izvor cirkulirajućeg VEGF-a u trudnoći u najvećoj mjeri decidualne žlijezde i makrofagi, možda jajnici i dojke, a posteljična resica tek u manjoj mjeri (68).

Hipoksija je najvažniji poticaj za brzo i prolazno stvaranje mRNA za VEGF *in vivo* i *in vitro*, vjerojatno preko faktora kojeg inducira hipoksija (HIF-1) (51, 69).

Neki citokini i/ili faktori rasta, poput EGF-a, bFGF-a, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, IL-6, IGF-1, ET-1 potiču sintezu VEGF-a u kulturi stanica.

Luteotropni hormon (LH), poznati aktivator adenilat ciklaze, povećava ekspresiju mRNA za VEGF u kulturi volovskih granulosa stanica. Isti učinak imaju i forbolni esteri, moćni aktivatori adenilat ciklaze (46).

Povišene serumske vrijednosti VEGF-a kod žena koje razviju hiperstimulacijski sindrom posljedica su stimulacije ovulacije humanim korionskim gonadotropinom (hCG-om) (70).

Steroidni hormoni utječu na ekspresiju VEGF-a *in vivo* i *in vitro*. I drugi hormoni, poput inzulina, kortikotropina i tireotropina, potiču lučenje VEGF-a (71).

Nastanak VEGF-a također je povećan u fiziološkim stanjima s povećanom angiogenezom (menstrualni ciklus, cijeljenje rane), ali i nekim bolestima (endometrioza, grozdasta potajnica, reumatoidni artritis, dijabetična retinopatija, tumori jajnika, maternice i dojke (72,73).

Von Hippel-Lindau tumorski supresorski faktor smanjuje ekspresiju gena osjetljivih na hipoksiju, uključujući i gen za VEGF (61).

### **Receptori za VEGF**

Jedno od najranijih zbivanja u endotelnoj staničnoj diferencijaciji je pojava receptora za VEGF. Veliki afinitet za vezanje VEGF-a je zabilježen već u hemangioblastima žumanjčane vreće (42,57).

Obitelj VEGF-a veže se za tri različita tirozin kinaza receptora: Flt-1 (VEGFR-1), KDR/Flk (VEGFR-2) i Flt-4 (VEGFR-3). Prva dva su slične građe: sedam petlji sličnih imunoglobulinu u izvanstaničnoj domeni, jedinstvena transmembranska hidrofobna domena i

dugačka jedinstvena citoplazmatska katalitička domena koja je prekinuta nekatalitičkim, tzv. umetnutim kinaza regijama.

Visoko su specifični za vaskularni endotel, ali otkriveni i u posteljici te mišićju maternice (49,59).

Inaktivacija gena za VEGFR-1 i VEGFR-2 kod miša rezultira smrću embrija između osmog i devetog dana. Kod nedostatka VEGFR-1 nema razvitka normalnih krvnih žila dok zbog nedostatka VEGFR-2 izostane diferencijacija hemangioblasta u endotelne stanice (74,75).

Nakon vezanja s ligandom zbiva se dimerizacija receptora i transfosforilacija tirozinskih ostataka u citoplazmatskoj domeni. Vezanje na suprotne polove VEGF-a, ovisno o vrsti receptora, olakšava provođenje signala (61,71). Flt-1 se veže za aminokiselinske ostatke negativnog, a KDR pozitivnog naboja (42).

VEGFR-1 ili Flt-1 (fms-like-tyrosine kinase) ima molekularnu težinu 180 kDa. Nalazi se u endotelu posteljične resice, izvanresičastom trofoblastu i Hofbauerovim stanicama (57,76,77).

Najznačajniji utjecaj Flt-1 je oblikovanje endotela u ranim fazama razvitka, ali su mitogeni učinci na endotelijalne stanice slabi (78). Migracija monocita kod upale i širenje tumorskih stanica zbog oslabljenog imunološkog odgovora domaćina posredovani su Flt-1 receptorom (79).

Ligandi za Flt-1 su VEGF-A, -B, PlGF i PlGF/VEGF heterodimeri. Sposobnost vezanja VEGF<sub>165</sub> za VEGFR-1 deset je puta veća od afiniteta za VEGFR-2 (80) ali je tirozinska fosforilacija slabija (44,43,97). Uništavanje druge imunoglobulinske domene humanog Flt-1 potpuno sprečava vezanje VEGF-a, a njena nazočnost unutar izvanstanične domene stranog receptora omogućava vezanje VEGF-a (81).

Nazočnost Flt-1 receptora u humanom amniju i decidui na mjestu preranog prsnuća ovoja bacaju novo svjetlo na ulogu VEGF-a majčinskog ili fetalnog porijekla kod preranog, ali i terminskog poroda s preranim prsnućem ovoja. Porast Flt-1 se javlja neovisno o korioamnionitisu, iako upala pojačava ekspresiju (82).

VEGFR-2 (KDR/Flk-1) je glikozirani protein molekularne težine 230 kDa koji je prisutan na endotelu i decidui (83).

Flk-1 (fetal liver kinase-1) ima 85% strukturne sličnosti s humanim analogom KDR (kinase domain region) (51).

Ligandi su VEGF-A, -C, -D i VEGF/PlGF heterodimeri. Vezanje za KDR omogućava mitogeni učinak VEGF-a na vaskularni endotel i regulaciju angiogeneze u embrionalnom, ali i

odraslom tkivu (84,85). In vitro, hipoksija stimulira ekspresiju Flt-1, ali ne i KDR receptora (42,57). In vivo, dolazi do povećanja i Flt-1 i Flk-1/KDR gena u srčanim krvnim žilama kod miokardijalnog infarkta i u ishemičnim regijama glioblastoma. Obzirom da Flt-1, ali ne i KDR, posjeduje vezivno mjesto za HIF-1 $\alpha$ , pretpostavka je da porast KDR nastaje indirektno, parakrinom stimulacijom iz ishemičnog tkiva (74).

Koncentracije Flt-1 i Flk-1/KDR su kod habitualnih pobačaja snižene u decidualnom endotelu, no ne i u posteljici (86).

Pokusi na mišjim embrijima pokazali su da postojanje samo transmembranske i izvanstanične (topive) regije Flt-1 ne ometa njihov razvitak, što znači da citoplazmatska tirozin-kinaza domena nije važna za endotelijalnu diferencijaciju i angiogenezu (64,81). Ta istraživanja upućuju da je Flt-1 samo inertna «zamka» za VEGF koja sprečava vezanje za moćniji VEGFR-2 (79,81). Drugi opovrgavaju takve stavove, dokazujući da Flt-1 posreduje u bar dvije biološke funkcije: indukciji tkivnog faktora u monocitima i endotelnim stanicama, te kemotaksiji monocita (87,88). U razvitku kolateralne cirkulacije nakon začepljenja krvnih žila od presudnog je značaja aktivacija monocita koji invadiraju stijenku krvne žile, oslobađaju proteaze i faktore rasta i započinju i/ili usmjeravaju proces preoblikovanja (89). Poticajni učinci VEGF-a na aktivatore i inhibitore plazminogena ostvareni su preko Flt-1 receptora.

VEGFR-3 (Flt-4) ima molekularnu težinu 195 kDa. Prisutan je na limfatičkoj vaskulaturi, a veže VEGF-C i -D.

Nedostatak Flt-4 dovodi do nakupljanja tekućine iz propusnih krvnih žila i rezultira smrću mišjeg embrija u drugoj polovici trudnoće (90).

Topivi Flt-1 (sFlt-1) je kraći, topivi oblik VEGFR-1 molekularne težine oko 110 kDa koji je izoliran iz endotelnih stanica umbilikalne vene. Sadrži samo izvanstanični dio molekule, bez sedme petlje slične imunoglobulinu (91,92,93).

Topivi receptor uglavnom tvori inaktivne komplekse s VEGF-om i VEGFR-2, a samo 5-10% je detektabilno u formi slobodnog proteina (97). Zbog inhibicije mitogene i proliferativne aktivnosti endotelijalnih stanica fiziološki je regulator angiogeneze (81).

Osim endotelnih, sFlt-1 stvaraju trofoblastne i decidualne stanice, monociti i dendriti. Pokazuje visok afinitet za heparin (81). Izolacija mRNA za sFlt-1 iz uzoraka tkiva bubrega, nadbubrežne žlijezde, aorte i pulmonalne arterije dokaz je da postoji lokalna regulacija aktivnosti VEGF-a i u odraslom organizmu (94).

Sekrecija sFlt-1 povećava se u trudnoći prateći masu posteljice (68). U mišjoj posteljici Flt-1 je prisutan jedanaestog dana, u vrijeme kada nema mjerljivih koncentracija sFlt-1. Od trinaestog dana mišje trudnoće koncentracije sFlt-1 postupno rastu, a Flt-1

sedamnaestog dana iščezava. Organi u razvitku poput posteljice osobito su osjetljivi na ravnotežu ovih receptora (94). Amnijska tekućina sadrži visoke koncentracije sFlt-1, nepoznatog izvora, koji u normalnim uvjetima neutralizira VEGF i/ili PlGF koji difundiraju iz posteljice (81). U kulturi posteljičnih stanica, hipoksija potiče sekreciju sFlt-1, a hiperoksija djeluje inhibitorno. sFlt-1 je povišen u trudnica koja će razviti preeklampsiju (95).

Poznat je još jedan prirodni inhibitor VEGF-a,  $\alpha$ 2-makroglobulin, serumski protein važan za održavanje žutog tijela (96). U postupcima potpomognute oplodnje, sniženje  $\alpha$ 2-makroglobulina upozorava na rizik nastanka hiperstimulacije (70).

Izoliran je i topivi oblik VEGFR-2 (sVEGFR-2), koji ne pokazuje svojstvo inhibicije mitogene aktivnosti (42).

### **Tie-1 i Tie-2 receptori**

Još jedna receptorska obitelj specifična za vaskularni endotel obuhvaća Tie-1 (tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor-like homology domains) i Tie-2 (tunica interna endothelial cell kinase). Nedostatak im se očituje u smanjenju broja endotelnih stanica, degeneraciji endokarda, edemu i krvarenjima (86).

U embriogenezi se javljaju nakon VEGFR-1 i -2 receptora, ali prije von Willebrandova faktora koji obilježava zreli endotel (51).

Osim u fetalnim i majčinskim krvnim žilama Tie-1 i -2 receptora ima i u trofoblastu (51). Kod habitualnih pobačaja manje su prisutni u posteljici i decidualnom endotelu (92). Povećana ekspresija nađe se kod fiziološke i patološke angiogeneze (maturacije folikula u jajniku, cijeljenja rane, tumorske angiogeneze) (43).

Ligand za Tie-1 je nepoznat.

Ang-1 je ligand za Tie-2, a Ang-2 je prirodni Tie-2 antagonist (45).

### **Neuropilin-1 (NP-1) i neuropilin-2 (NP-2)**

Poznat je još jedan receptor za VEGF-A, -B, -E i PlGF-2. Neuropilin-1 (NP-1) je netirozinski receptor s kratkom citoplazmatskom i dugačkom izvanstaničnom domenom. (97). Prvotni otkriveni značaj NP-1 odnosio se na provođenje neuralnih impulsa u aksonu. Nedavno je dokazano da njegov nedostatak ili prekomjerna ekspresija uzrokuju oštećenu vaskularizaciju žumanjčane vreće i anomalije velikih krvnih žila i srca. U fetalnom je srcu

NP-1 prisutan zajedno s VEGFR-1 u koronarnim krvnim žilama, a s VEGFR-1 i -2 u kapilarama endo- i miokardija (72).

Istodobna ekspresija NP-1 i VEGFR-2 četverostruko povećava vezanje VEGF<sub>165</sub>, koji ima sličan afinitet za oba receptora (18,46,93). Te činjenice ukazuju da je NP-1 vjerojatno koreceptor za VEGFR-2, a ne funkcionalni receptor (72).

Neutropilin-2 (NP-2) zajedno s VEGFR-3 postoji na limfatičkom endotelu (72).

Miševi s genskim defektom za NP-2 pokazuju defekt limfangiogeneze (72).

### **Molekule slične VEGF-u**

Posljednjih godina su kod sisavaca identificirani geni slični genu za VEGF. Svi imaju važnu ulogu u rastu i diferencijaciji endotela krvožilnog, ali i limfatičnog sustava.

Prvi iz obitelji faktora slične građe bio je placentarni faktor rasta (PIGF). Ostali su: VEGF-B, VEGF-C i VEGF-D. Po svojoj su građi homodimerički glikoproteini. Dvije podjedinice koje tvore osam karakterističnih cisteinskih čvorova povezane su disulfidnim vezama (98,99).

#### **1.2.2. Placentarni faktor rasta (PIGF)**

Kao što mu ime govori, PIGF je identificiran u posteljici i staničnim kulturama koriokarcinoma (116). PIGF mRNA i protein su metodom *in situ* hibridizacije osim u trofoblastu i vezivu resice dokazani u amnijskom epitelu i endotelu umbilikalne vene (100,101,102,103).

U odraslom organizmu PIGF je otkriven u mozgu, srcu, plućima, skeletnim mišićima i štitnjači (87). Ključni je regulator patološke angiogeneze u nekim tumorima (bubrega, testisa, štitnjače) i aktivaciji upalnih stanica (u proliferativnoj dijabetičkoj retinopatiji, npr.) (104,105).

Dijeli sličnu strukturnu homolognu regiju kao i PDGF i VEGF, s podudarnošću između 46-53% (105).

Gen za PIGF lokaliziran je na 14. kromosomu (106). Deficit oba alela za PIGF nema utjecaja na posteljičnu i/ili embrionalnu angiogenezu (107). Različitim povezivanjem u toku prerade preteče glasničke RNA nastaju tri poznate izoforme PIGF-a: PLGF-1 (PIGF<sub>131</sub>), PIGF-2 (PIGF<sub>152</sub>) i PIGF-3 (PIGF<sub>183</sub>) (108,109,110). Ekson 6 kodira bazični 21-

aminokiselinski redosljed, jedinstven za PIGF-2, koji omogućava vezanje za heparin i NP-1 receptor (111).

U fibroblastima je ekspresija gena za PIGF inducirana hipoksijom (112). Khaliq i sur.(115) su 1999.g. pokazali da hipoksija smanjuje PIGF mRNA i protein u trofoblastu.

Receptor za PIGF je VEGFR-1 (114,115,116). Učinak PIGF-a se ostvaruje lokalno, autokrinim putem na trofoblast, parakrinim na deciduu i endotel resice, ali možda i sistemski, u majčinoj cirkulaciji.

PIGF štiti trofoblast od apoptoze uzrokovane citokinima kao što je TNF- $\alpha$  (117,118). Ima minimalni učinak na endotelnu staničnu proliferaciju i propusnost krvnih žila. Razlozi leže u osobitostima Flt-1 koji je najvećim dijelom u topivom obliku i ima veći afinitet za VEGF.

In vitro PIGF-1 stimulira proliferaciju izvanresičastog trofoblasta u ranoj trudnoći. PIGF-2 nema taj učinak, ali u većim koncentracijama inhibira diobu endotelnih stanica (119,120).

PIGF pojačava angiogenezu na nekoliko načina:

- zauzimanjem Flt-1 receptora nakon čega se VEGF-A veže za potentniji KDR;
- tvorbom heterodimera s VEGF koji se s visokim afinitetom vežu za KDR receptor;
- utjecajem na stabilnost i sazrijevanje krvnih žila preko njihova glatkog mišićja;
- aktiviranjem upalnih stanica koje imaju utjecaj na razvitak kolateralne cirkulacije;
- mobilizacijom hematopoetskih matičnih stanica iz koštane srži.

### **Homo- i heterodimeri PIGF i VEGF**

Različite izoforme VEGF-a i PIGF-a mogu tvoriti homo- i heterodimere. Ova dimerizacija utječe na vezanje za heparin, receptore i biološke funkcije (121,122).

PIGF homodimeri čak i u visokim koncentracijama imaju neznatni učinak na poticanje sinteze DNA u endotelu i kemotaksiju. PIGF/VEGF heterodimeri su jednaki, ili bolji stimulatori staničnog kretanja od VEGF homodimera, ali imaju dvadeset do pedeset puta manju sposobnost umnažanja stanica (105). PIGF/VEGF heterodimeri vežu se za KDR s sličnim afinitetom kao i VEGF.

Receptori također tvore homo- (Flt-1/Flt-1, Flk-1/Flk-1) i heterodimere (Flk-1/Flt), a ligandi su sve poznate izoforme VEGF-a i PlGF-a. Biološki odgovor može stoga biti vrlo raznolik (123,124).

### **VEGF-B**

VEGF-B je drugi otkriveni član obitelji, prvotno nazvan VRF (VEGF-related factor). Alternativnim sastavljanjem glasničke RNA stvorene su dvije izoforme. Prva je vezana u stanici, sastavljena od 167 aminokiselina molekularne težine 21 kDa. Druga je sekretorna molekula od 188 aminokiselina molekularne težine 32 kDa.

Najviše VEGF-B raspoređeno je u poprečno-prugastim mišićima i srcu. U posteljici ga ima više nego VEGF-A.

Receptor za VEGF-B je VEGFR-1. Angiogeni utjecaj ostvaruje stvaranjem heterodimera s VEGF-A.

Čini se da hipoksija, kao ni steroidni hormoni, nemaju utjecaja na izlučivanje VEGF-B.

### **VEGF-C**

VEGF-C je sekretorni dimerički glikoprotein sastavljen od 399 aminokiselina, molekularne težine 47 kDa.

Veže se za VEGFR-2 i -3 (125).

Najvažniji mu je učinak stimulacija rasta limfatičkog sustava. Ima oko sto puta slabiji angiogeni učinak od VEGF-A (126,127,128,129).

Rasprostranjen je u mnogim embrionalnim tkivima, kao i u odraslom organizmu. Osim u posteljici, gdje je zastupljeniji od VEGF-A, najviše ga ima u srcu, jajnicima, tankom crijevu i štitnjači. Oslobođaju ga aktivirani trombociti (130).

Hipoksija nema učinka na lučenje VEGF-C (126).

### **VEGF-D i VEGF-E**

VEGF-D je sličan VEGF-C po slabom angiogenom učinku i vezanju za VEGFR-2 i-3. Njegova uloga u trudnoći i embriogenezi za sada je nepoznata.

Najviše ga ima u srcu, mišićima i tankom crijevu.



VEGF-E je zajednički naziv za grupu proteina sličnih VEGF-u koji potiču od nekih vrsta orf virusa, patogena za ovce, koze i rijetko čovjeka. Infekcija rezultira akutnom mikrovaskularnom proliferacijom i dilatacijom.

VEGF-D i -E vežu se za VEGFR-2 i NP-2.

Virusni proteini imaju značajni angiogeni potencijal koji je usporediv s VEGF-A, bez obzira što nemaju sposobnost vezanja heparina.

### **1.2.3. Inzulinu slični faktori rasta (IGF)**

Inzulinu slični čimbenici rasta (insulin-like growth factors (IGFs) imaju značajnu ulogu u kontroli rasta i sazrijevanja kako fetusa tako i placente. Snabdijevanje ploda putem placente osnovnim supstratima kao što su kisik i prehrambene tvari s jedne strane određuje, izravno i neizravno, maksimum do kojega fetus može rasti, a s druge strane održava već formirana tkiva. Ograničena prehrana majke također mijenja i strukturu placente. Ograničena prehrana majke smanjuje placentu, uslijed čega dolazi do zaostajanja u rastu ploda i smanjenog kapaciteta razmjene tvari. Osim toga, ograničenje prehrane majke prouzročit će i druge promjene u strukturi placente, što dodatno podupire pretpostavku o reduciranoj funkciji razmjene supstrata. Među tim promjenama zabilježene su i povećana debljina sinciotrofoblasta kao i smanjenje sveukupne površine za razmjenu tvari, kako u sredini tako i na kraju trudnoće.

Ograničena prehrana majke mijenja i razinu cirkulirajućih IGF. Točnije, IGF-I, IGF-II i IGFBP-3 u plazmi se smanjuje dok IGFBP-2 raste, kako u sredini trudnoće tako i u visokoj trudnoći (131). U skladu s poznatom ulogom IGF-II u olakšavanju prodiranja citotrofoblasta u deciduu i u njezine krvne žile u početnoj trudnoći (132), reducirani cirkulirajući IGF-II majke, u sredini trudnoće ali ne i u visokoj trudnoći, povezan je sa smanjenom težinom fetusa kao i sa smanjenom površinom sinciotrofoblasta te s povećanom debljinom sinciotrofoblasta u zamoraca (133). U visokoj trudnoći, međutim, smanjen omjer IGF-II, IGFBP-2, te eventualno reducirana raspoloživost IGF-II u krvi majke, povezani su sa smanjenom težinom placente odnosno fetusa, što upućuje na postojanje interakcije između čimbenika rasta i vezujućih proteina u razdoblju placentalnog razvoja. S druge strane, majčin cirkulirajući IGF-I povezan je s modulacijom placentalnog razvoja u kasnijoj trudnoći. Smanjene vrijednosti cirkulirajućeg IGF-I i njegova glavnog prenositelja IGFBP-3, kao i redukcija IGFBP-1 u krvi majke, povezani su sa smanjenom količinom trofoblasta i smanjenom prokrvoljenosti placente, uslijed čega je pred kraj trudnoće difuzija dodatno

otežana (134). Ovi nalazi u skladu su s pretpostavkom da sistemski IGF-II u majci pospješuje rast placente i diferencijaciju u prvoj polovici gestacije kada trofoblast prodire u deciduu, dok sistemski IGF-I i modulacija njegove raspoloživosti (zahvaljujući snabdijevanju putem IGFBP-1 i -3) mogu utjecati na razvoj placentalne strukture tijekom druge polovice trudnoće, osobito u slučajevima kada je prehrana ograničena.

Julie Owens (135) istraživala je o različitim posljedicama placentalne restrikcije na razinu fetalnog IGF i na rast fetusa. Endokrini odgovor fetusa na obilje supstrata u njegovu okruženju djelomično odražava djelovanje snabdjevenosti supstratima na rast fetusa i njegov metabolizam. Među glavnim anaboličkim hormonima zaduženim za rast in utero su i inzulinu slični čimbenici rasta (IGF), inzulin i hormon tiroidne žlijezde, dok su glavni katabolički hormoni kateholamini i kortizol. U ovaca i u ostalih vrsta, redukcijom placentalnog rasta i funkcija u visokoj trudnoći smanjuje se «dostava» kisika, glukoze i nekih amino kiselina fetusu te se i njihove cirkulirajuće razine u fetusa smanjuju, dok razine nekih drugih amino kiselina rastu, što bi moglo biti odraz razlaganja bjelančevina i kataboličkog stanja (136). Ovo zadnje moglo bi u ovčjih fetusa sa zastojem u rastu potkraj trudnoće djelomično biti odraz reducirane cirkulirajuće razine kao i genske ekspresije IGF-I u većini fetalnih tkiva, što je u korelaciji s razinama kisika, glukoze i inzulina u krvi fetusa potkraj trudnoće (120 dana, s tim da termin nastupa otprilike 150 dana nakon koncepcije) (135, 136). Davanjem IGF-I fetusu ovce sa zastojem u rastu normalizira se razina cirkulirajućeg IGF-I i povećava se i/ili obnavlja rast i sazrijevanje nekih mekih tkiva te skeleta. Ovaj nalaz posve je u skladu s nalazom da reducirana količina IGF igra značajnu ulogu u usporavanju rasta i razvoja (137). Nasuprot tomu, razine cirkulirajućeg IGF-II, kojega ima u većim količinama, u fetusa ovaca sa zastojem u rastu ostaju nepromijenjene kroz duže vrijeme, tj. sve do 127 dana gestacije, kada razina kortizola u krvi fetusa počinje ubrzano rasti (135, 138). Ovo upućuje na činjenicu da smanjena raspoloživost IGF-II može doprinijeti usporavanju fetalnog rasta, no tek potkraj trudnoće. Pa ipak, djelovanje placentalne restrikcije na količinu i post-translacijsku promjenu raznih IGF vezujućih proteina koji moduliraju biološku aktivnost tih istih IGF i od kojih mnogi imaju veći afinitet prema IGF-II, tek treba istražiti. Osim toga, utjecaj placentalne restrikcije i ograničene «dostave» supstrata na količinu IGF receptora tipa 2, koji modulira raspoloživost IGF-II za vezivanje na IGF receptor tipa 1, inzulin i atipični receptor inzulina, još je uvijek nepoznat.

U ime svojih suradnika, Anthony Carter (139) izvijestio je o eksperimentima kojima se na fetusu zamorca, tijekom ograničenog rasta, ispituje ekspresija IGF-II i njegovih vezujućih proteina. U prvom setu eksperimenata, ograničenje rasta fetusa postignuto je

jednostranim podvezivanjem uterine arterije 30. dana gestacije (termin = 67 dana) Uzorci tkiva uzimani su između 55. i 57. dana. Rezultat jednostranog podvezivanja uterine arterije bio je manji fetus s manjom placentom. Ovaj model ograničavanja fetalnog rasta također inducira asimetričan rast pri kojem je mozak slabo razvijen (139). Uzorci fetalne krvi i amnionske tekućine iz skupine fetusa ograničenog rasta i iz kontrolne skupine fetusa ispitani su na IGF vezujuće proteina (binding proteins = BP). U tu svrhu korišteni su Western ligand blotting i immunoblotting. Glavni IGFBPi u fetalnoj plazmi migrirali su na 55-45, 30 i 24 kDa i identificirani su kao IGFBP-2, -2 i -4. IGFBP-3 bio je prisutan kao dvostruki i predstavljao je glikozilirane i neglikozilirane oblike tog proteina. IGFBP-2, bio je najzastupljeniji protein i identificiran je uz pomoć Western blottinga. Osim toga, blijeda traka u plazmi fetusa iz kontrolne skupine i mnogo snažnija traka u plazmi fetusa iz skupine kojoj je ograničen rast identificirana je kao IGFBP-1, uz pomoć pročišćenog humanog IGFBP-1 konstrukta i humane amnionske tekućine koji su korišteni kao standardi. Ograničavanje fetalnog rasta povezano je s povišenim razinama proteina IGFBP-2 i smanjenim razinama IGFBP-2 u fetalnoj plazmi.

Uzorci placente, fetalne jetre i drugih organa uzeti su kako bi se uz pomoć Northern blottinga izvršila ekstrakcija totalne RNA te izmjerila ekspresija IGF-II i IGFBP 1-6 mRNA. U tu svrhu, «sonde» zamoračkog IGF i IGFBP cDNA klonirane su na temelju humanih slijedova i slijedova glodavaca. Glavnim izvorom vezujućih bjelančevina u plazmi pokazala se fetalna jetra, u kojoj je zabilježeno povećanje IGFBP-2 mRNA. U fetalnom mišiću zabilježena povećana ekspresija IGFBP-3 mRNA. U skladu s efektom nerazvijenog mozga, u fetalnom mozgu nije bilo promjena u ekspresiji IGF-II ili IGFBP mRNA.

Druga serija eksperimenata obavljena je da bi se utvrdilo jesu li te promjene izazvane hipoksijom. Zamorci su držani u hipobaričkim uvjetima (simulirajući visinu od 4000 m), od nekoliko dana poslije koncepcije pa sve do 45. dana gestacije, kada su uzeti uzorci krvi, amnionske tekućine i tkiva (140). Kontrolna skupina držana je u uvjetima ambijentalnog pritiska (1600 m). Suprotno očekivanju, pokazalo se da razlika u visini nije utjecala na tjelesnu težinu, težinu placente i težinu fetalnih organa. Zabilježeno je, međutim, maleno ali dosljedno povećanje razina IGFBP-2 u fetalnoj plazmi, iako manje izraženo negoli nakon podvezivanja uterine arterije. Osim toga, u ovim eksperimentima, razine IGFBP-1 u plazmi bile su nedvojbeno povišene. to vjerojatno upućuje na činjenicu da zamorački gen IGFBP-1 ima potpuno funkcionalni odgovor na hipoksiju, što se pokazalo i za humani gen IGFBP-1 (141). Mogućnost da bi rast ovih fetusa bio ograničen i u vrijeme termina ne može se sasvim isključiti. Međutim, očito je da se promjene u ekspresiji vezujućih proteina mogu pojaviti i

ako nema promjene u fetalnoj težini. Ovaj nalaz u skladu je s novim shvaćanjem u kontekstu fetalnog programiranja, prema kojemu prenatalni stres može znatno promijeniti fetalne parametre, a da pri tom ne izazove mjerljivu promjenu tjelesne težine (142).

### **IGF-I je važan regulator fetalnog rasta**

Iako je jasno da je IGF-I važan za fetalni rast, značaj endokrine, parakrine i autokrine aktivnosti, kao i potencijalna regulatorna, nasuprotnoj permisivnoj ulozi IGF-I, u rastu fetusa u razdoblju visoke trudnoće tek treba istražiti. Pokazano je da su razine cirkulirajućeg IGF-I u fetusa regulirane fetalnim koncentracijama glukoze i inzulina, neovisno od tih istih koncentracija u majke (143). Fetalni odgovor na pothranjenost također je paralelan s odgovorom majke: smanjuje se razina cirkulirajućeg IGF-I i IGFBP-3, a povećava se razina IGFBP-1 i IGFBP-2 (144). Ovaj je nalaz u skladu s posredničkom ulogom IGF-I u nutritivnoj regulaciji fetalnog rasta u kasnoj trudnoći.

Akutne infuzije relativno visokih doza IGF-I (30-50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ) korištene su da bi se utvrdili mehanizmi s pomoću kojih bi IGF-I mogao regulirati fetalni rast. Infuzija IGF-I u fetus povećava fetalnu apsorpciju glukoze i amino kiselina iz placente i inhibira placentalnu produkciju laktata (145). Nasuprot tomu, infuzija u majku povećava apsorpciju glukoze i amino kiselina u placentu iz cirkulacije majke i pospješuje placentalnu produkciju laktata (146). Stoga Harding zaključuje da razlika između razina IGF-I u maternalnoj i fetalnoj cirkulaciji regulira distribuciju supstrata između majke, placente i fetusa.

Istraživanja su pokazala da je IGF-I važan i u regulaciji distribucije supstrata unutar samog fetusa. Infuzija IGF-I inhibira kako apsorpciju tako i oksidaciju serina u tijelu, a da pri tom ne mijenja ukupnu fetalnu apsorpciju ili oksidaciju serina (147). To podrazumijeva transfer oksidacije ove amino kiseline iz tijela fetusa u ostala tkiva, vjerojatno u utrobu. Ovaj nalaz konzistentan je s prethodnim studijama koje su pokazala da infuzija visoke doze IGF-I tijekom 10 dana pospješuje rast utrobe (visceral growth) fetusa ovaca, bez povećavanja ukupne veličine tijela fetusa (137).

IGF-I može također regulirati i placentalnu funkciju. Placentalna produkcija laktata regulirana je razlikom između razine IGF-I u cirkulaciji fetusa i iste te razine u cirkulaciji majke. Budući da placentalna produkcija laktata može biti mehanizam uz pomoć kojega se ugljikohidrati prilagođavaju tako da ih fetus može konzumirati, ona može igrati značajnu ulogu u fetoplacentalnoj adaptaciji na različite vidove «dostave» hranjivih tvari. Osim toga, placenta može doprinijeti regulaciji koncentracija cirkulirajućeg fetalnog IGF-I. Kad su

fetalne koncentracije visoke, placenta se pojavljuje da bi uklonila IGF-I iz fetalne cirkulacije, a kada su fetalne koncentracije niske, placenta oslobađa IGF-I u fetalnu cirkulaciju. Značaj ove pojave nije jasan. Međutim, moguće je da ova fetoplacentalna interakcija može pridonijeti regulaciji distribucije supstrata u situaciji kad je njihova «dostava» ograničena.

Ako je IGF-I važan za regulaciju fetalnog rasta, tada bi pospješena dostava IGF-I trebala intenzivirati fetalni rast. Međutim, do danas nije prikupljeno dovoljno dokaza da je to doista tako. Harding (145) i Bloomfield posjeduju preliminarne podatke koji upućuju na to da infuzija niske doze IGF-I (50 µg/dan) može pospješiti fetalni rast u fetusa ovaca čiji je rast ograničen. U fetusa ovaca koji su zaostajali u rastu uslijed maternalne sporidesmnske toksičnosti (facijalni ekcem), rast je bio pospješten. Međutim, u fetusa koji su rasli normalno, infuzija IGF-I nije imala učinka na rast. Ovaj zanimljivi nalaz u suprotnosti je s prethodnim eksperimentima i ukazuje na to da fetusi čiji je rast ograničen mogu biti relativno rezistentni na djelovanje IGF-I (Jensen i suradnici, 1999). IGF-I može također značajno utjecati na fetalni rast zbog toga što je jedan od sastojaka amnionske tekućine. Tijekom visoke trudnoće fetus normalno gutava velike količine amnionske tekućine i usprkos niskim koncentracijama IGF-I u amnionskoj tekućini, fetus ipak dolazi s njim u kontakt. U eksperimentalnom modelu janjeta infuzija IGF-I ekvivalentna količinama koje fetus normalno proguta (2-7 µg/dan) spriječila je ograničenje rasta koje je bilo inducirano ezogfagealnom atrezijom te je također obnovila rast fetalne utrobe (gut) (148).

Rigmor Austgulen (Trondheim, Norveška) i njegovi suradnici željeli su utvrditi da li se rezultati dobiveni u istraživanjima na životinjama mogu ekstrapolirati na komplikacije u humanoj trudnoći, osobito na ograničeni intrauterini rast i preeklampsiju. Uzorak krvi iz pupkovine uzet je prilikom 12.804 porođaja obavljenih u Rogaland Central Hospital u južnoj Norveškoj. Pet stotina osamdeset pet trudnoća (s jednim djetetom) s porodom u terminu odabrano je nasumce. Razine IGF-I i IGFBP-1 izmjerene su u plazmi iz pupkovine. Značajna korelacija zabilježena je između porođajne težine i razine IGF-1, jednako u dječaka i u djevojčica, kao i značajno povećanje IGFBP-1 proporcionalno s porastom porođajne težine (149).

U spomenuta 12 804 poroda bilo je tri stotine i sedam slučajeva preeklampsije. Za svaki slučaj preeklampsije odabrane su dvije kontrole. Od slučajeva s preklampsijom, njih šezdeset sedam klasificirani su kao ozbiljni slučajevi. U toj skupini, IGF-I je bio niži, a IGFBP-1 je bio viši nego u slučajevima blage preeklampsije. Koncentracije IGF-I i IGFBP-1 kod blage preeklampsije nisu se razlikovale od onih koje su zabilježene kod kontrola. Najznačajnije promjene u IGF-I i IGFBP-1 zabilježene su u skupini ozbiljnih preeklampsija, i

onih u kojih se preeklampsija pokazala rano. Porođajna težina je standardizirana kao omjer između zabilježene i očekivane porođajne težine (derivirane iz krivulja težine dobivenih ultrazvučnim mjerenjima). Prema tim omjerima, novorođenčad je podijeljena u četiri različite težinske kategorije. Na svakoj razini porođajne težine IGF-I bio je niži, a IGFBP-1 je bio viši u skupini ozbiljnih preeklampsija ili onih koje su se pojavile rano, negoli u skupini kontrola slične težine. Analize su pokazale da ozbiljna preeklampsija i porođajna težina neovisno jedna o drugoj utječu na razine IGF-I, dok su porođajna težina, ali ne i preeklampsija, povezane s IGFBP-1 (149). Ovi nalazi upućuju na mogućnost da IGF-I, u određenoj mjeri, sudjeluje u specifičnoj patogenezi preeklampsije ili pak ona na njega djeluje. Nasuprot tomu, sve registrirane promjene IGFBP-1 mogu se pripisati istovremenoj ograničenosti rasta, bez ikakvog dodatnog utjecaja preeklampsije.

### **1.3. ŠEĆERNA BOLEST I TRUDNOĆA**

Šećerna bolest je sindrom koji nastaje zbog apsolutnog ili relativnog manjka ili promijenjenog djelovanja inzulina, a rezultat je hiperglikemija. Dijabetes u trudnoći donosi brojne probleme kako za majku tako i za dijete. Loša metabolička kontrola u trudnica s pregestacijskim dijabetesom (šećerna bolest tipa 1 i tipa 2) je združena s povećanim rizikom od spontanih pobačaja, preeklampsije, rađanja djece s kongenitalnim malformacijama, mrtvorodne, asfiktične i makrosomne djece, a češća je i neonatalna smrtnost. Dobrom metaboličkom kontrolom (vrijednosti glukoze na tašte ispod 5 mmol/L, a dvosatne postprandijalne vrijednosti manje od 7,8 mmol/L i vrijednosti HbA1c manje od 7%) učestalost će komplikacija biti kao i u zdravoj populaciji trudnica.

Šećerna bolest tipa 1 je kronična autoimuna bolest koja je nastala zbog destrukcije beta stanica pankreasa. Predispozicija za nastanak bolesti je determinirana genom koji se nalazi na šestom kromosomu i koji je združen s HLA sustavom: HLA-DP, DQ, i DR, a 40% žena sa šećernom bolesti tipa 1 posjeduje DR3 i DR4 (150). Konačna ekspresija autoantitijela u osoba sa šećernom bolesti tipa 1 je rezultat genetskih, ali i okolišnih čimbenika kao što su virusne infekcije, kemijski toksini, pa čak i proteini mlijeka. Šećerna bolest tipa 1 se javlja u osoba bijele rase, s najvećom učestalošću u Skandinavskim zemljama. U osoba žute rase se rijetko javlja.

Rizik nastanka šećerne bolesti tipa 1 djece rođene od majki sa šećernom bolesti tipa 1 iznosi 1%-3%. Rizik je veći i iznosi 6,1% ako otac boluje od tipa-1 šećerne bolesti. Ako oba roditelja imaju tip-1 šećernu bolest vjerojatnost da će i djeca oboljeti je čak 20% (151).

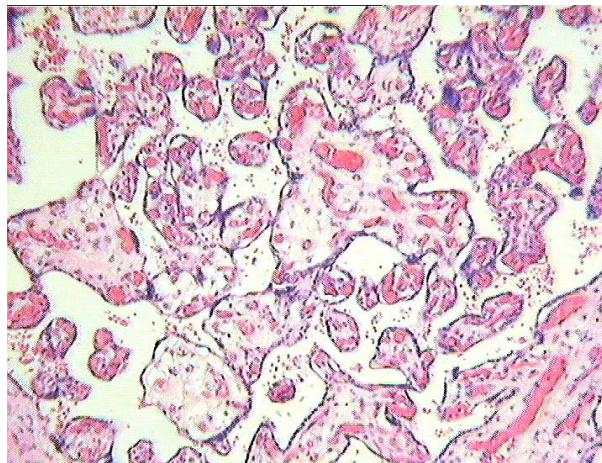
Prije otkrića inzulina perinatalni mortalitet dijabetičnih trudnica iznosio je 65%, a materni mortalitet čak 30%. Nakon otkrića inzulina dolazi do naglog pada maternog mortaliteta. Danas se materni mortalitet dijabetičnih trudnica ne razlikuje od opće populacije. Perinatalni mortalitet (PN) se sporo smanjivao pa je tako još 1940. godine u brojnim svjetskim centrima iznosio više od 20%. Posljednjih godina dolazi do znatnog sniženja perinatalnog mortaliteta ali je još uvijek u velikim centrima viši od 5%. Loša metabolička kontrola dijabetičnih trudnica (hiperglikemija) je združena s višim perinatalnim mortalitetom i morbiditetom (152).

Zahvaljujući dobroj metaboličkoj kontroli trudnica dijabetičarki, antenatalnoj i neonatalnoj skrbi, praćenju stanja fetusa kardiokografijom i ultrazvukom, analizi plodove vode radi dokaza fetalne plućne zrelosti i liberalnijem stavu prema dovršenju poroda carskim rezom posljednje četiri godine perinatalni mortalitet u Klinici za ženske bolesti i porode smanjena je na samo 1,8%. Od 108 djece rođenih od trudnica sa šećernom bolesti tipa 1 jedno je bilo mrtвороđeno, a jedno neonatalno umrlo. Prije 30 godina perinatalni mortalitet je iznosio više od 20%. Najniži perinatalni mortalitet je u skupini djece rođene između 38 i 40 tjedana trudnoće. Znatno je viši u skupini djece rođene između 33-37 tjedana, a najviši u skupini djece rođene između 29-32 tjedana trudnoće. Važno je naglasiti da nakon 40 tjedana trudnoće dolazi do povećanja perinatalnog mortaliteta. Iznenadna fetalna smrt se objašnjava nastankom fetalne hipoksije. Hiperglikemički fetus ne tolerira hipoksiju zbog povećane akumulacije mliječne kiseline što dovodi do teškog oštećenja mozga. Istraživanjem fetalnog metabolizma glukoze našli smo u terminskih fetusa dijabetičnih trudnica visoku razinu glukoze, inzulina, IGF-1 i istodobno nizak pH, niži pO<sub>2</sub>, povišen pCO<sub>2</sub>, niske standardne bikarbonate i povišen deficit baza. Na temelju tih nalaza može se zaključiti da majčina hiperglikemija dovodi do fetalne hiperglikemije, hipoksije i acidoze. Zbog toga je fetalni mortalitet u dijabetičnih trudnica još uvijek viši nešto u odnosu na zdrave trudnice. Skupina djece s intrauterinim zastojem u rastu također ima visok PM (33,3%) (153). Međutim, u skupini makrosomne djece u odnosu na normosomnu, nije nađen viši perinatalni mortalitet (153). Dijabetičarke s hipertenzijom i preeklampsiom imaju značajno viši PM, u njih dominira fetalni mortalitet, dok je u normotenzivnih dijabetičnih trudnica PM znatno niži.

Trudnice sa šećernom bolešću tipa-1 imaju visoku učestalost spontanijh pobačaja ako je glikozilirani hemoglobin u prvom tromjesečju viši od 12%, ili ako je srednja vrijednost

glukoze na tašte viša od 6,7 mmol/L. Učestalost spontanih pobačaja je u korelaciji s metaboličkom kontrolom.

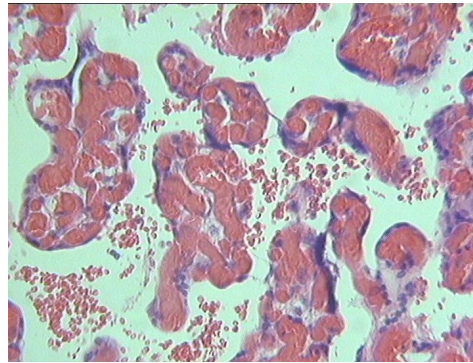
S obzirom na to da je dijabetes majke prilično česta komplikacija trudnoće, promjene na posteljici već su odavno privukle pozornost. Posteljice iz trudnoća s loše nadziranom dijabetesom su povećane, debele i pletoričnog izgleda uslijed fetalne hipervolemije i majčine hiperglikemije (154). U slučajevima blage intolerancije glukoze u trudnoći je utvrđeno da je težina posteljice također povećana (kao i fetoplacentarni težinski omjer) (155), dok se u slučaju dobro nadzirane razine glikemije težina posteljice ne razlikuje od normale (156). Što se histoloških osobina tiče, u oko 40% posteljica iz dijabetične trudnoće građa posteljičnih resica odgovara gestacijskoj dobi, a u preostalih 60% mjestimice se nalaze žarišta nezrelih resica (disocijacija zrenja) (sl. 7.), a rjeđe su pretjerano zrelog izgleda za dob gestacije (maturitas praecox).



**Slika 7. Žarište posteljičnih resica čija zrelost ne odgovara gestacijskoj dobi (disocijacija zrenja)**

U tih su posteljica resice često edematozne i nalik posteljicama iz trudnoća s fetalnom eritroblastozom, ali vaskularnost resica može biti vrlo različito izražena. U mnogim su posteljicama resice normalne vaskularizacije, no mogu biti i hipovaskularne ali krvne žile u resicama mogu biti i umnožene. Prema Altshuleru, kada se u barem tri područja posteljice na 10 ili više vidnih polja srednjeg povećanja nalazi više od 10 kapilara u više od 10 terminalnih resica, radi se o promjeni nazvanoj korangioza (chorangiosis) (41). U praksi, izgled promjene je i na malom povećanju dovoljno karakterističan, tako da je rijetko nužno točno brojanje (157) (sl.8.), ali potrebno je

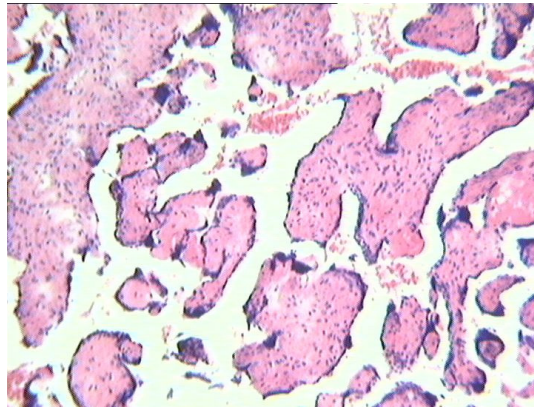




**Slika 8. Korangioza posteljice**

iskustvo kako se jaki zastoj uz dilataciju kapilara, dobroćudni tumor korangiom ili difuzna korangiomatoza ne bi proglasili za tu promjenu (158). Obložni citotrofoblast često je upadljiv, a bazalna membrana pokazuje žarišno ili difuzno zadebljanje (158, 159). Iz toga je jasno da je kod dijabetesa trofoblast oštećen, o čemu svjedoče nekroza sinciotrofoblasta te posljedična proliferacija trofoblasta, a uzrok oštećenja nije potpuno jasan. Uz normalan uteroplacentarni protok krvi, oštećenje je vjerojatno povezano s metabolički nenormalnim okruženjem (majčinom krvlju u interviloznim prostorima) u kojem se resice nalaze. Dokazano je kako posteljično tkivo stvara kisikove radikale koji izazivaju fibroblaste na stvaranje obilnije međustanične tvari, što znači da u takvim slučajevima postoji postplacentarna hipoksija (160). Ako je trudnoća komplicirana nefropatijom ili eklampsijom, posteljica može sadržavati infarkte, koji su u posteljicama iz trudnoće komplicirane samo dijabetesom rijetki.

U posteljicama iz dijabetičkih trudnoća povećana je mogućnost nalaza tromboze fetalnih arterija, koja se može jasno vidjeti i makroskopski na površini korijalne ploče. Histološki, unutar krvne žile u korijalnoj ploči nalazi se već organizirani tromb ili tromb u organizaciji (sl. 8.), dok su podležee posteljične resice avaskularne zbog obliteracije lumena žile te fibrozirane strome. Trofoblast im je održan (sl. 9.).



**Slika 9. Zreli trofoblast u dijabetičkih trudnica**

Što se tiče nalaza na posteljici iz trudnoće komplicirane dijabetesom, može se zaključiti kako njene makroskopske i histološke osobine u prvom redu ovise u kakvoći regulacije razine glukoze u krvi majke, te kako promjene koje se u njoj mogu naći nipošto nisu specifične, ali su prilično karakteristične za šećernu bolest.

Diabetes mellitus je bolest koja u trudnoći ima specifičan utjecaj na razvoj posteljice, a time i posljedično na rast i razvoj fetusa. Kao hipoteza postavlja se pitanje mogu li i kako čimbenici rasta posteljice u promijenjenim uvjetima kod dijabetičkih trudnoća u sasvim ranom i kasnom periodu trudnoće utjecati na poremećaj placentacije, odnosno angiogenezu placentne. Tu su brojni čimbenici rasta posteljice, ali veći značaj imaju vaskularni endotelni čimbenik rasta VEGF, placentni čimbenik rasta PlGF i inzulinu slični faktor rasta IGF-II. Povremeni izostanak fiziološke transformacije spiralnih arterija mogu biti u vezi sa smanjenim kapacitetom posteljice kod dijabetičkih trudnica u izmjeni plinova i posljedično hipoksijom u te djece.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su sljedeći:

1. Odrediti razinu PIGF, VEGF i IGF-II tijekom trudnoće.
2. Odrediti razliku koncentracije PIGF, VEGF i IGF-2 u istraživanim skupinama.
3. Histološki analizirati ležišta placente i usporediti vrijednosti PIGF odnosu na a) urednu pretvorbu spiralnih arterija, b) djelomičnu pretvorbu spiralnih arterija i c) izostalu pretvorbu krvnih žila.
4. Usporediti razina čimbenika angiogeneze u serumu majke i umbilikalnom serumu i naći korelaciju između težine placente, težine novorođenčeta i razine pojedinih čimbenika angiogeneze.

### 3. ISPITANICE I NAČIN ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je prospektivno. Istraživanu skupinu čine 42 trudnice s dijabetesom tipa-1, a kontrolnu 34 zdrave trudnice odgovarajuće dobi i pariteta, te urednog tijeka trudnoće. Pratile su se jednoplodne trudnoće. Tijek trudnoća je praćen uobičajenim mjerama antenatalne skrbi (redoviti ginekološki pregledi, laboratorijske pretrage, UZV pregledi, CTG). Trudnice-dijabetičarke koje su tijekom trudnoće razvile još neku komplikaciju isključene su iz istraživanja. Gestacijska dob se računa od prvog dana zadnje mjesečnice, uz korekciju prema ultrazvučnoj dobi - nalazu mjerenja transvaginalnim ultrazvukom (u okviru rutinske obrade trudnice). Tijekom čitave trudnoće prikupljali su se uzorci venske krvi trudnica, i to u razmacima od 3-4 tjedna, prilikom redovitih kontrolnih pregleda. U porodu su od roditelja uzimani uzorci krvi za određivanje serumskih koncentracija VEGF-a, VEGFR-1, PlGF-a i IGF-II. Neposredno po porodu uzeo se uzorak krvi iz umbilikalne vene, a posteljica je izvagana. Iz krvi se uobičajenim laboratorijskim postupkom (centrifugiranje na 4000 okr./min. tijekom 10 minuta, prikupljanje nadtalog pipetom) izdvojen serum. Uzorci krvi su uzimani u standardne epruvete, a nakon centrifugiranja serum se čuvao na  $-75^{\circ}\text{C}$  do određivanja čimbenika angiogeneze. VEGF, PlGF, VEGFR-1 i IGF-II su se određivali ELISA metodom.

Kod poroda dovršenih carskim rezom učinjena je biopsija ležišta placente veličine  $2 \times 1 \times 0,5$  cm. Uzorci su se odmah zamrznuli i čuvali u hladnjaku na temperaturi od  $-75^{\circ}\text{C}$  do histološkog pregleda. Na histološki pregled su poslane sve placentе.

Serumske koncentracije PlGF-a, VEGF-a i IGF-II određivane su u Institutu «Ruđer Bošković». Određivanje vrijednosti PlGF-a u uzorcima provest će se ELISA tehnikom, komercijalnim kitom Quantikine (R&D Systems, Minneapolis, SAD) za ljudski PlGF, sVEGFR-1, VEGF i IGF-II, koji određuju ukupne (vezane i slobodne) faktore rasta i topljivi receptor.

Zabilježen je način dovršenja poroda, spol djeteta, porodna težina i dužina novorođenčadi.

## STATISTIČKE METODE

Statistička obrada učinjena je računalnim programom SPSS ver. 11.0, na osobnom računalu.

Izmjerene numeričke varijable su opisane sljedećim parametrima:

- aritmetičkom sredinom
- standardnom devijacijom

Za usporedbu tri ispitivane skupine primijenjeni su neparametrijski statistički testovi, jer se zbog nevelikog broja trudnica u pojedinim skupinama nije moglo procijeniti slijede li numeričke varijable Gaussovu distribuciju.

Za usporedbu tri nezavisne skupine primijenjen je Kruskal-Wallisov test, dok je za usporedbe grupa u kombinaciji parova primijenjen Mann-Whitney-ev test s korekcijom, obzirom na uvjete višestrukog testiranja.

Za usporedbu PlGF-a, VEGFR-1 VEGF-a i IGF-II izmjerenog kod majke pri porodu i iz umbilikalne vene djeteta po pojedinim skupinama primijenjen je neparametrijski test za dva zavisna uzorka (Wilcoxon-ov test sume rangova s predznacima).

Za sve testove razina značajnosti bila je  $p < 0,05$ .

Koncentracije PlGF-a, VEGFR-1, VEGF-a i IGF-II tijekom trudnoće grafički su prikazane «box plot» prikazom.

## 4. REZULTATI

U kontrolnoj skupini (zdrave trudnice) od ukupno 34 poroda 25 poroda je dovršeno vaginalno, a 9 carskim rezom, dok je u istraživanoj skupini (dijabetične trudnice) 13 poroda dovršeno vaginalno, a 29 carskim rezom. Svi su porodi dovršeni nakon 37. tjedna trudnoće.

	Zdrave trudnice (n=34)	Trudnice s dijabetesom tipa-1 (n=42)	Statistička značajnost
Dob trudnica (godine)	29,32±3,7	29,4±4,8	n.s.
Tjedni dovršenja trudnoće (tjedni)	38,5±1,2	38,3±1,3	n.s.
Težina placente (g)	520,5±105	555,7±154	n.s.
Novorođenačka težina (g)	3330,1±552,3	3565,8±603,6	n.s.
Novorođenačka duljina (cm)	50,1±3,5	50,4±2,3	n.s.
Apgar nakon 1. min.	8,7±2,2	8,3±2,6	n.s.
Apgar nakon 5. min.	8,9±1,1	8,4±2,2	n.s.

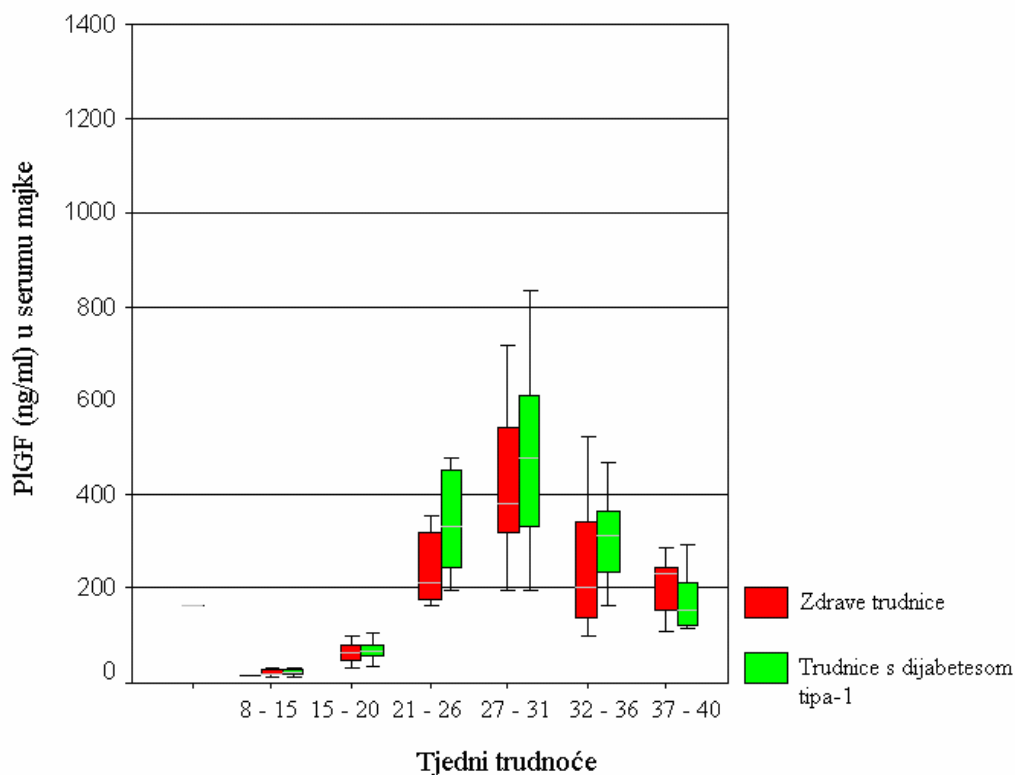
**Tablica 1. Opći podaci trudnica, njihove novorođenčadi i posteljica istraživanih skupina**

Novorođenčad i placente trudnica istraživane i kontrolne skupine su podjednake težine, težine placente su 555,7 g u odnosu na 520,5 g u zdravih trudnica. Težina novorođenčadi je u ispitivanoj skupini 3565,8 g u odnosu na 3330,1 g zdravih trudnica (Tablica 1.). Nije nađena statistički znakovita razlika u dobi trudnica i trajanja trudnoće, tj. dob trudnice je 29,32 u odnosu na 29,4 godine. Dovošenje trudnoće je u 38. tjednu za obje skupine. Također nije nađena statistički znakovita razlika Apgar indeksa nakon prve i nakon pete minute u dvije istraživane skupine.

	Zdrave trudnice	Trudnice s dijabetesom tipa-1	Statistička značajnost (p)
Razina PIGF između 8-15 tjedana trudnoće (pg/mL)	21,68±4,91 (n=34)	23,16±4,94 (n=42)	n.s.
Razina PIGF između 16-20 tjedana trudnoće (pg/mL)	62,89±17,70 (n=30)	69,39±21,78 (n=39)	n.s.
Razina PIGF između 21-26 tjedana trudnoće (pg/mL)	212,88±153,78 (n=32)	268,07±199,58 (n=41)	n.s.
Razina PIGF između 27-31 tjedana trudnoće (pg/mL)	390,41±138,07 (n=33)	440,77±173,03 (n=42)	n.s.
Razina PIGF između 32 – 36 tjedana trudnoće	243,76±112,33 (n=31)	312,43±181,42 (n=42)	n.s.
Razina PIGF između 37 – 40 tjedana trudnoće	217,6±133,2 (n=34)	196,0±135,6 (n=42)	n.s.

**Tablica 2. Razina PIGF tijekom trudnoće u istraživanim skupinama**

Uspoređujući vrijednosti PIGF tijekom trudnoće u dvije istraživane skupine nije nađena statistički znakovita razlika. Vrijednosti PIGF progresivno rastu od početka trudnoće do 31. tjedna trudnoće, kada su nađene najviše vrijednosti - razina PIGF između 27 -30 tjedna trudnoće: kontrolna skupina (390,41±138,07) : istraživana skupina (440,77±173,03). Uspoređujući vrijednosti PIGF između dviju istraživanih skupina nije nađena statistički znakovita razlika. Nakon 31. tjedna trudnoće (između 32.-36. tjedna trudnoće) dolazi do pada vrijednosti PIGF u obje istraživane skupine. Još niže vrijednosti su nađene nakon 37. tjedna trudnoće - PIGF između 37 - 40 tjedna trudnoće: kontrolna skupina (217,6±133,2) : istraživana skupina (196,0±135,6). Uspoređujući vrijednosti PIGF između dviju istraživanih skupina nije nađena statistički znakovita razlika (Tablica 2.).



**Grafikon 1. Razine PIGF majčine plazme u pojedinim tjednima trudnoće u dijabetičnih i zdravih i trudnica**

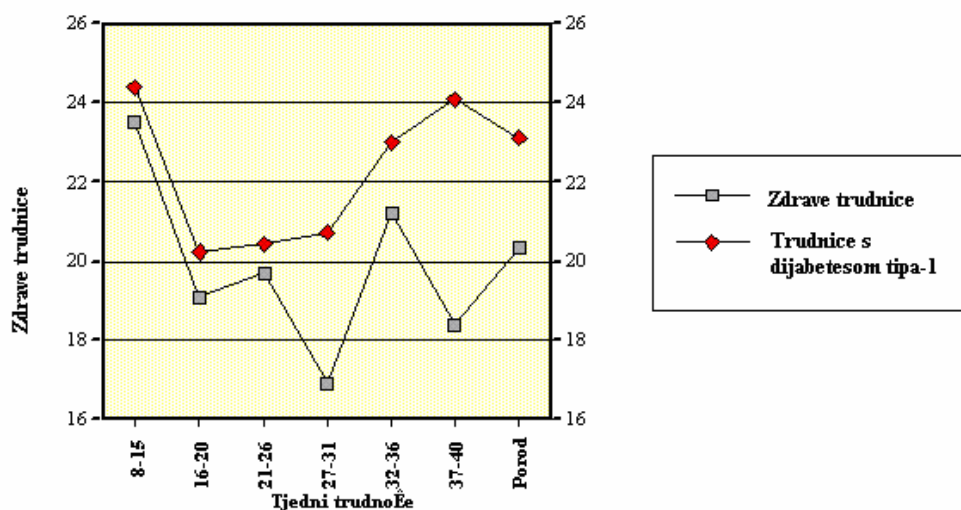
Grafikon 1 prikazuje kretanje PIGF u dvije istraživane skupine tijekom trudnoće. Vrijednosti PIGF u trudnica s dijabetesom tipa – 1 su nešto više u odnosu na vrijednosti PIGF u zdravih trudnica sve do 36. tjedna trudnoće, ali razlika nije statistički znakovita. Nakon 37 tjedna trudnoće i neposredno nakon poroda dolazi do pada razine PIGF u obje skupine, nešto više u trudnica s dijabetesom tipa–1, ali razlika nije statistički znakovita.



	Zdrave trudnice (n=34)	Trudnice s dijabetesom tipa-1 (n=42)	Statistička značajnost (p)
Razina PIGF u majčinom serumu (pg/ml)	249,6±193,1	178,0±191,0	n.s.
Razina PIGF u serumu umbilikalne vene (pg/ml)	17,6±21,9	12,0±18,2	n.s.
pH krvi umbilikalne arterije	7,261±0,043	7,201±0,073	<0,05
PO <sub>2</sub> krvi umbilikalne arterije (kPa)	4,12±1,38	2,62±0,90	<0,05
Deficit baze u krvi umbilikalne arterije (mmol/L)	-7,33±1,56	-8,81±2,34	<0,05

**Tablica 3. Razina PIGF u majčinom serumu i serumu umbilikalne vene neposredno nakon poroda i vrijednosti pH, pO<sub>2</sub> i BE krvi umbilikalne arterije**

Uspoređujući vrijednosti PIGF u majčinom serumu i serumu umbilikalne vene neposredno nakon poroda u dvije istraživane skupine nije nađena statistički znakovita razlika. U zdravih trudnica su vrijednosti PIGF u serumu i u umbilikalnoj veni nešto veći ali nisu statistički značajni. Vrijednosti pH, pO<sub>2</sub> i deficit baze u umbilikalnoj arteriji su bile znakovito niže u istraživanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu sa statističkom značajnosti razine p <0,05 (Tablica 3).

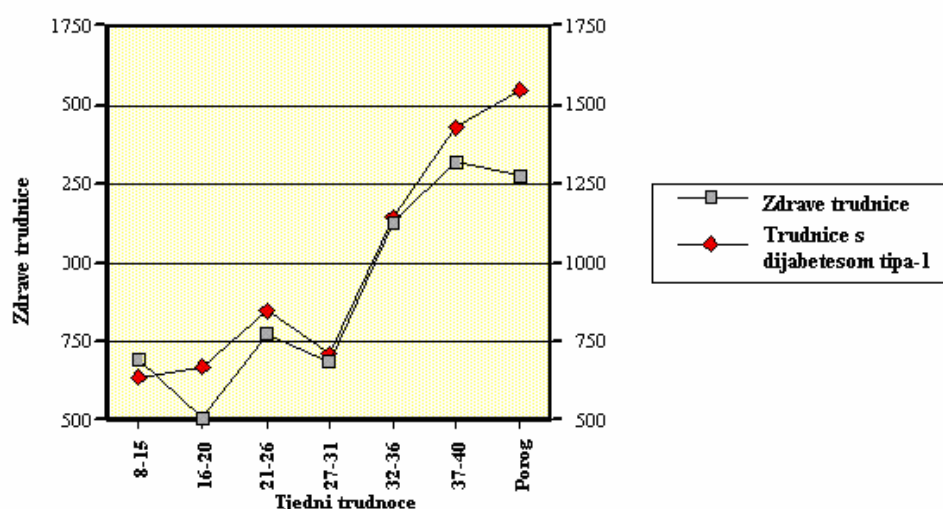


**Grafikon 2. Razine VEGF tijekom trudnoće u istraživanim skupinama**

Grafikon 2 i tablica 4. prikazuju srednje vrijednosti VEGF majčine plazme u pojedinim tjednima trudnoće u dijabetičnih i zdravih trudnica. Najviše razine VEGF su nađene u prvih 15 tjedana trudnoće, trudnica s dijabetesom 24,415 i zdravih trudnica 23,520 pg/mL. Nađene su više vrijednosti VEGF u dijabetičnih trudnica tijekom trudnoće, ali statistički znakovita razlika između istraživanih skupina je nađena između 27-31 tjedna trudnoće, trudnica s dijabetesom 20,744 i zdravih trudnica 16,871 pg/mL i neposredno nakon poroda, trudnica s dijabetesom 23,183 i zdravih trudnica 18,383 pg/mL.

	Zdrave trudnice	Trudnice s dijabetesom tipa-1	Statistička značajnost (p)
Razina VEGF između 8-15 tjedana trudnoće (pg/mL)	23,529±4,6197 (n=34)	24,415±5,2989 (n=42)	n.s.
Razina VEGF između 16-20 tjedana trudnoće (pg/mL)	19,133±3,5082 (n=30)	20,233±4,8225 (n=39)	n.s.
Razina VEGF između 21-26 tjedana trudnoće (pg/mL)	19,742±3,8665 (n=32)	20,428±4,0685 (n=41)	n.s.
Razina VEGF između 27-31 tjedana trudnoće (pg/mL)	16,871±,2121 (n=33)	20,744±4,9631 (n=42)	<0,05
Razina VEGF između 32 – 36 tjedana trudnoće	21,225±6,4935 (n=31)	23,055±5,4491 (n=42)	n.s.
Razina VEGF između 37 – 40 tjedana trudnoće	18,83±6,4935 (n=31)	24,12±5,4491 (n=42)	n.s.
Razina VEGF neposredno nakon poroda	18,383±4,0257 (n=34)	23,183±5,1312 (n=42)	<0,05
Razina VEGF u umbilikalnij veni	755,813±482,4501 (n=34)	924,224±648,5763 (n=42)	n.s.

**Tablica 4. Razina VEGF tijekom trudnoće i u porodu u istraživanim skupinama**

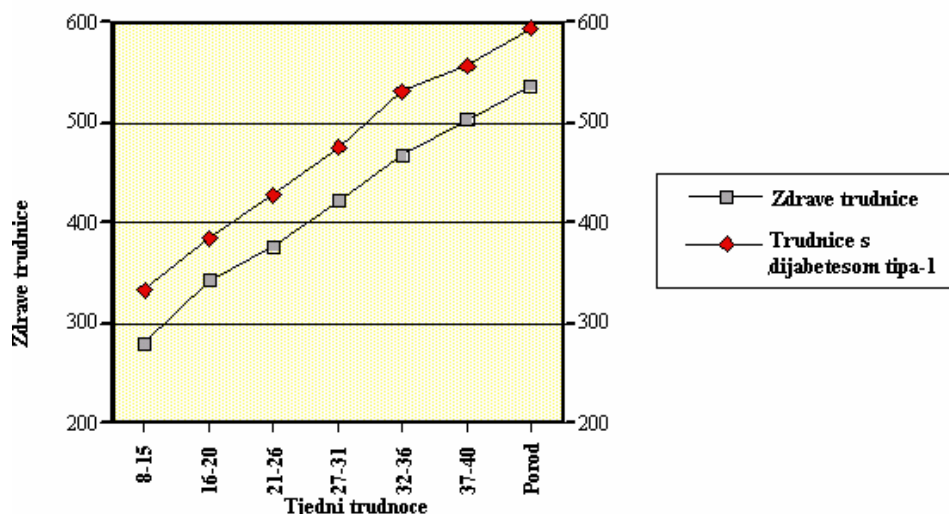


**Grafikon 3. Razine VEGFR-1 tijekom trudnoće u istraživanim skupinama**

Grafikon 3. i Tablica 5. prikazuju srednje vrijednosti VEGFR-1 tijekom pojedinih tjedana trudnoće u trudnica s diabetesom i zdravih trudnica. Vrijednosti su više u trudnica s diabetesom u odnosu na zdrave trudnice. Vrijednosti u 27-31 tj. su niže, u trudnica s diabetesom 712,136 pg/mL i zdravih trudnica 690,720 pg/mL tada rastu do poroda u trudnica s diabetesom 1543,84 pg/mL i zdravih trudnica 1278,04 pg/mL i nema statističke značajnosti, kao ni u razinama VEGFa u umbilikalnoj veni.

	Zdrave trudnice	Trudnice s dijabetesom tipa-1	Statistička značajnost (p)
Razina sVEGFR-1 između 8-15 tjedana trudnoće (pg/mL)	694,859±207,99 (n=34)	638,824±211,11 (n=42)	n.s.
Razina sVEGFR-1 između 16-20 tjedana trudnoće (pg/mL)	606,910±153,47 (n=30)	649,751±300,04 (n=39)	n.s.
Razina sVEGFR-1 između 21-26 tjedana trudnoće (pg/mL)	776,543±161,2 (n=32)	850,862±412,2 (n=41)	n.s.
Razina sVEGFR-1 između 27-31 tjedana trudnoće (pg/mL)	690,720±170,87 (n=33)	712,136±266,39 (n=42)	n.s.
Razina sVEGFR-1 između 32 – 36 tjedana trudnoće	1124,40±363,1 (n=31)	1148,414±608,03 (n=42)	n.s.
Razina sVEGFR-1 između 37 – 40 tjedana trudnoće	1321,5±287,6 (n=27)	1453,3±544,9 (n=39)	n.s.
Razina sVEGFR-1 neposredno nakon poroda	1278,04±365,58 (n=34)	1543,84±608,03 (n=42)	n.s.
Razina sVEGFR-1 u umbilikalnoj veni	198,38±269,32 (n=34)	286,164±151,31 (n=42)	n.s.

**Tablica 5. Razina sVEGFR-1 tijekom trudnoće i u porodu u istraživanim skupinama**



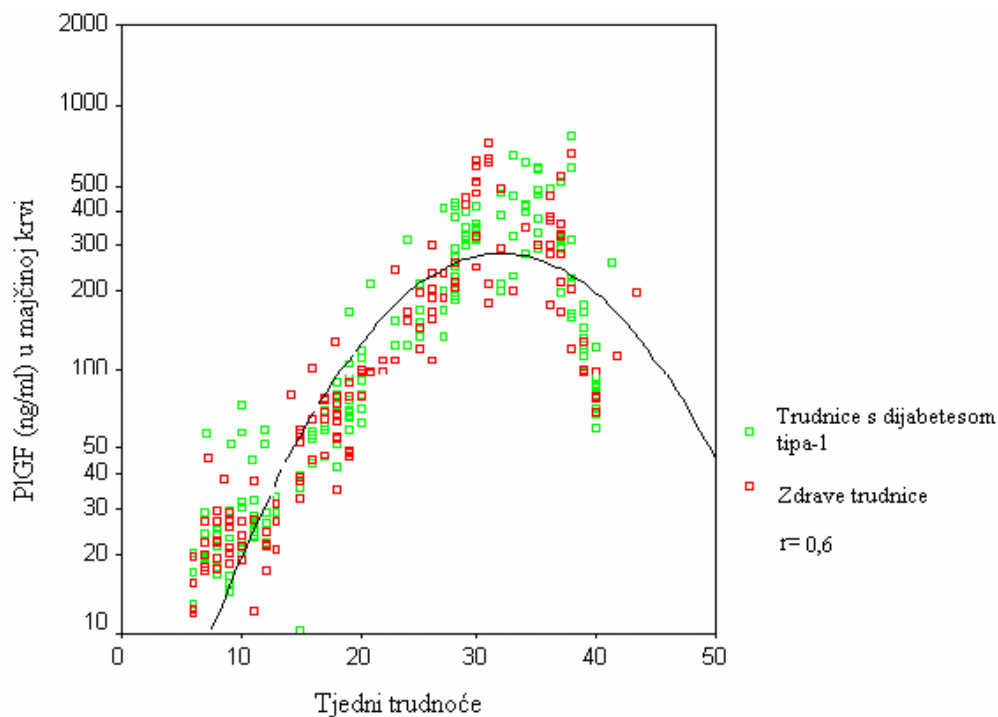
**Grafikon 4. Razine IGF-2 tijekom trudnoće u istraživanim skupinama**

Grafikon 4. i tablica 6. prikazuju srednje vrijednosti IGF-2 tijekom trudnoće u istraživanim skupinama. Vrijednosti su više u skupini trudnica s diabetesom i povećavaju se tijekom trudnoće, ali nema statističke značajnosti. Vrijednosti IGF-2 u trudnica s diabetesom kreću se 334,213 do 598,04 pg/mL, a u zdravih trudnica od 280,517 do 537,17 pg/mL.

Razina IGF-2 u umbilikalnoj veni trudnica s diabetesom je 199,35, a u zdravih trudnica 168,200 pg/mL i nema statističke značajnosti.

	Zdrave trudnice	Trudnice s dijabetesom tipa-1	Statistička značajnost (p)
Razina IGF-II između 8-15 tjedana trudnoće (pg/mL)	280,517±157,38 (n=34)	334,213±171,98 (n=42)	n.s.
Razina IGF-II između 16-20 tjedana trudnoće (pg/mL)	342,620±184,96 (n=30)	384,969±227,56 (n=39)	n.s.
Razina IGF-II između 21-26 tjedana trudnoće (pg/mL)	376,76±179,41 (n=32)	427,788±133,55 (n=41)	n.s.
Razina IGF-II između 27-31 tjedana trudnoće (pg/mL)	421,750±217,15 (n=33)	476,029±173,88 (n=42)	n.s.
Razina IGF-II između 32 – 36 tjedana trudnoće	487,275±224,13 (n=31)	531,143±179,81 (n=42)	n.s.
Razina IGF-II između 33- 37 tjedana trudnoće	504,25±205,97 (n=29)	556,086±199,61 (n=39)	n.s.
Razina IGF-II neposredno nakon poroda	537,17±249,03 (n=34)	598,04±163,24 (n=42)	n.s.
Razina IGF-II u umbilikalnoj veni	168,200±133,36 (n=34)	199,355±48,24 (n=42)	n.s.

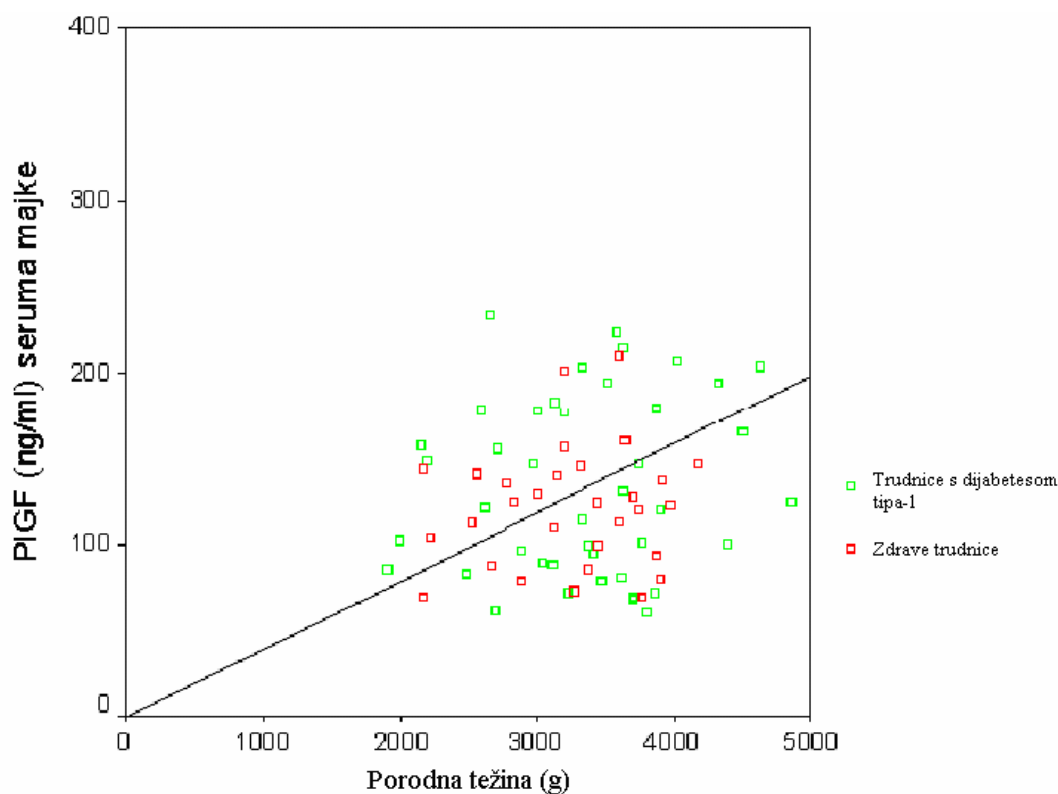
**Tablica 6. Razina IGF-II tijekom trudnoće i u porodu u istraživanim skupinama**



**Grafikon 5. Korelacija razine PIGF i tjedana trudnoće u dijabetičnih i zdravih trudnica**

Vrijednosti u trudnica s dijabetesom su više nego u zdravih trudnica i u međusobnoj su korelaciji. Vrijednosti su izrazito povišene u trudnica s diabetesom od 27. do 36. tjedna trudnoće u odnosu na vrijednosti kod zdravih trudnica.

Uspoređujući pojedinačne vrijednosti razine PIGF u dvije istraživane skupine i tjedana trudnoće dobiven je statistički znakovit koeficijent korelacije ( $r=0,6$ ;  $p<0,001$ ).

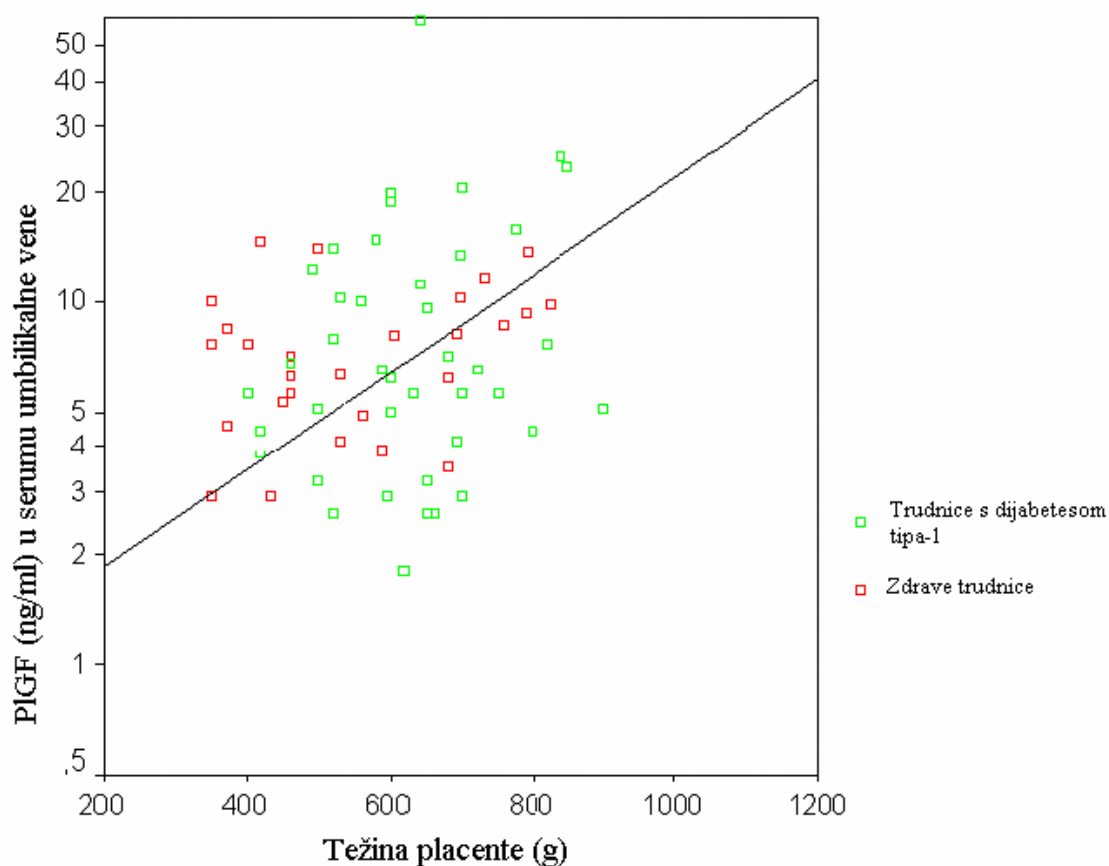


**Grafikon 6. Korelacija razine PIGF i porodne težine novorođenčadi u dijabetičnih i zdravih trudnica**

Vrijednosti PIGF su više u trudnica s diabetesom u odnosu na vrijednosti PIGF zdravih trudnica. Razina PIGF seruma majki koje su rodile hipertrofičnu djecu bila je viša od razine PIGF seruma majki koje su rodile eutrofičnu djecu.

Nađena je statistički značajna korelacija ( $r=0,4$ ) između novorođenačke težine i razine PIGF seruma majke.

Nije nađena razlika PIGF u odnosu na način dovršenja poroda (razina PIGF u majki koje su rodile carskim rezom  $244,9 \pm 78,14$  pg/mL :  $229,0 \pm 59,3$  pg/mL razine PIGF majki koje su rodile vaginalno)



**Grafikon 7. Korelacija između težine placente i PIGF**

Vrijednosti PIGF su više u trudnica s dijabetesom u odnosu na vrijednosti PIGF zdravih trudnica. Nađena je statistički značajna korelacija ( $r=0,5$ ) između težine placente i razine PIGF umbilikalne vene.

	Zdrave trudnice	Trudnice s dijabetesom tipa-1	(p)
PIGF u krvi majke (pg/ml)	249,6±193,1	178,0±191,0	n.s.
PIGF u veni umbilikalnis (pg/ml)	17,6±21,9	12,0±18,2	n.s.

**Tablica 7. Razine PIGF u serumu majke i umbilikalne vene neposredno nakon poroda**

Vrijednosti PIGF u umbilikalnoj veni su niže u odnosu na razinu PIGF seruma majke. Uspoređujući vrijednosti PIGF seruma majke i vene umbilikalnis dobiven je pozitivan i statistički signifikantan koeficijent korelacije ( $r=0,4$ )

SKUPINE	FIZIOLOŠKE PROMJENE	NEPOTPUNE FIZIOLOŠKE PROMJENE	ODSUTNE FIZIOLOŠKE PROMJENE	UKUPNO
ZDRAVE TRUDNICE	9 (100,0%)	0 (0%)	0	9 (100%)
TRUDNICE S DIABETESOM TIPA-1	24 (83%)	5 (17%)	0	29 (100%)
UKUPNO	33 (85%)	5 (13%)	0	38 (100%)

**Tablica 8. Karakteristike ležišta placente**

Na tablici 8 prikazane su karakteristike ležišta placente u trudnica dobivenih kod poroda dovršenih carskim rezom. Kod 5 (17%) trudnica sa DM tipa-1 nađene su nepotpune fiziološke promjene spiralnih arterija.

	FIZIOLOŠKE PROMJENE (n=33)	NEPOTPUNE FIZIOLOŠKE PROMJENE (n=5)	STATISTIČKA ZNAČAJNOST (p)
TJEDNI PORODA	37,34±5,6*	36,81±3,5	*p<0,05
TEŽINA PLACENTE	615,7±164,6*	518,7 ±234,2	*p<0,001
PORODNA TEŽINA	3540,7±609*	2793,3±566,7	*p<0,001
PIGF u majčinom serumu (pg/mL)	252,1±18,6*	218,5±31,2	*p<0,001
PIGF u serumu vene umbilikalis (pg/mL)	13,6±2,6*	11,3±3,2	*p<0,05

**Tablica 9. Karakteristike ležišta placente, tjedni dovršenja trudnoće, težina placente i novorođenčadi, razina PIGF u majčinom serumu i serumu vene umbilikalis.**

Karakteristike ležišta placente, fiziološke promjene u odnosu na nepotpune fiziološke promjene su statistički značajne u odnosu na tjedne dovršenja trudnoće, težine placente i novorođenčadi, razine PIGF u majčinom serumu i serumu vene umbilikalis. Statistička značajnost je p<0,05 do p<0,01 (Tablica 9).



## 5. RASPRAVA

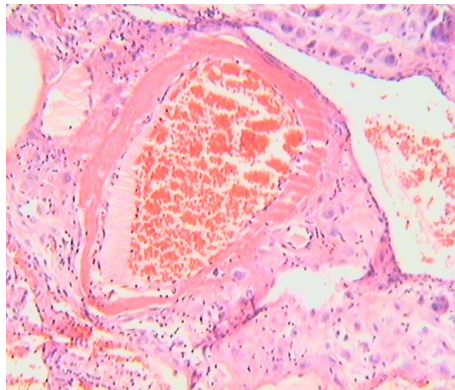
Vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) i placentarni čimbenik rasta (PlGF) su ključni čimbenici i u fiziološkim i patološkim uvjetima. VEGF ispoljava svoje djelovanje preko svojih receptora (tirozin kinaze) VEGFR-1/Flt-1 i VEGFR2/KDR koji se nalaze u endotelnim stanicama.

Dva receptora VEGFR-1/Flt-1 i VEGFR-2/KDR se smatraju da su specifični za endotel. U placenti endotelne i neendotelne stanice imaju VEGF receptore. VEGF se pokazao kao potentni stimulator endotelne stanične proliferacije i stvara PA (aktivator plazminogena) potreban za proteolitičko razaranje. PlGF se pokazao slabim stimulatorom kemotakse endotelnih stanica i proliferacije u fiziološkoj koncentraciji od <100ng/ml. VEGF također inducira mikrovaskularni permeabilitet, dok PlGF nema djelovanja, ali potencira djelovanje VEGF u malim dozama. Ovaj različit efekt se objašnjava činjenicom da se PlGF veže na VEGFR-1/Flt-1 ali ne i na VEGFR-2/KDR. Vezivanjem PlGF na VEGFR-1/Flt-1 nastaje negranajuća angiogeneza. VEGF i VEGFR-2/KDR su visoki u ranoj trudnoći i njihova koncentracija se smanjuje trajanjem trudnoće, dok PlGF i Flt-1 se povećavaju trajanjem trudnoće. VEGF i VEGFR-2/KDR su uključeni u prva dva tromjesečja trudnoće u nastajanju bogate granajuće kapilarne mreže od mezenhimalne i nezrelih resica, dok PlGF i VEGFR-1/Flt-1 su uključeni u stvaranju dugih slabo granajućih terminalnih kapilara u trećem tromjesečju. VEGF stimulira ekstravazaciju tekućine i proteina, otpušta dušični oksid (NO).

Osnovne funkcije posteljice vrše se kroz placentarnu membranu, koja odjeljuje majčinu od fetalne krvi. Do 12. tjedna trudnoće placentarnu membranu izgrađuju sinciciotrofoblast, citotrofoblast, mezenhim i endotel krvnih žila resica. Pupanjem trofoblasta intermedijarnih resica pojavljuju se osnove novih resica u koje ubrzo urasta stroma i ogranci krvnih kapilara. U usporedbi s resicama iz ranijih stadija placentarnog razvoja, terminalne resice su brojnije i manjeg su promjera (oko 70 $\mu$ m u drugom te oko 40 $\mu$ m u trećem tromjesečju trudnoće). Početkom drugog tromjesečja smanjuje se broj stanica citotrofoblasta i mezenhimskih stanica strome, a u trećem tromjesečju one uglavnom nestaju.

Prokrvljenost resica tijekom trudnoće raste, a količina strome značajno se smanjuje. Pred kraj trudnoće teško je uočiti Hofbauerove stanice zbog sinusoidne dilatacije krvnih kapilara. U zrelim intermedijarnim i terminalnim resicama količina međustanične tvari strome je značajno manja, a vlakanca su uglavnom smještena kružno, u tankom sloju oko krvnih kapilara.

Razina PIGF u serumu zdravih i dijabetičnih trudnica se povećava oko četiri puta od prvog do drugog tromjesečja (tablica 2 i grafikon 1). Ovo povećanje PIGF utječe na rast placente i održavanje adekvatne placentalne cirkulacije. Nakon 30. tjedna trudnoće dijabetičnih i zdravih trudnica, dolazi do pada razine PIGF. U trudnica s preeklampsijom vrijednosti PIGF u serumu majke se neznatno mijenjaju od 30. tjedna trudnoće do poroda. Te vrijednosti su niže od vrijednosti PIGF seruma zdravih trudnica. Ove razlike u razini PIGF mogu se objasniti razinom kisika u placenti. Dokazano je da je kisik glavni regulator ravnoteže VEGF i PIGF. Hipoksija povećava djelovanje VEGF, a hiperoksija smanjuje. Uspješna placentacija dovodi do niskog otpora krvnih žila zbog transformacije spiralnih arterija (slika 9).



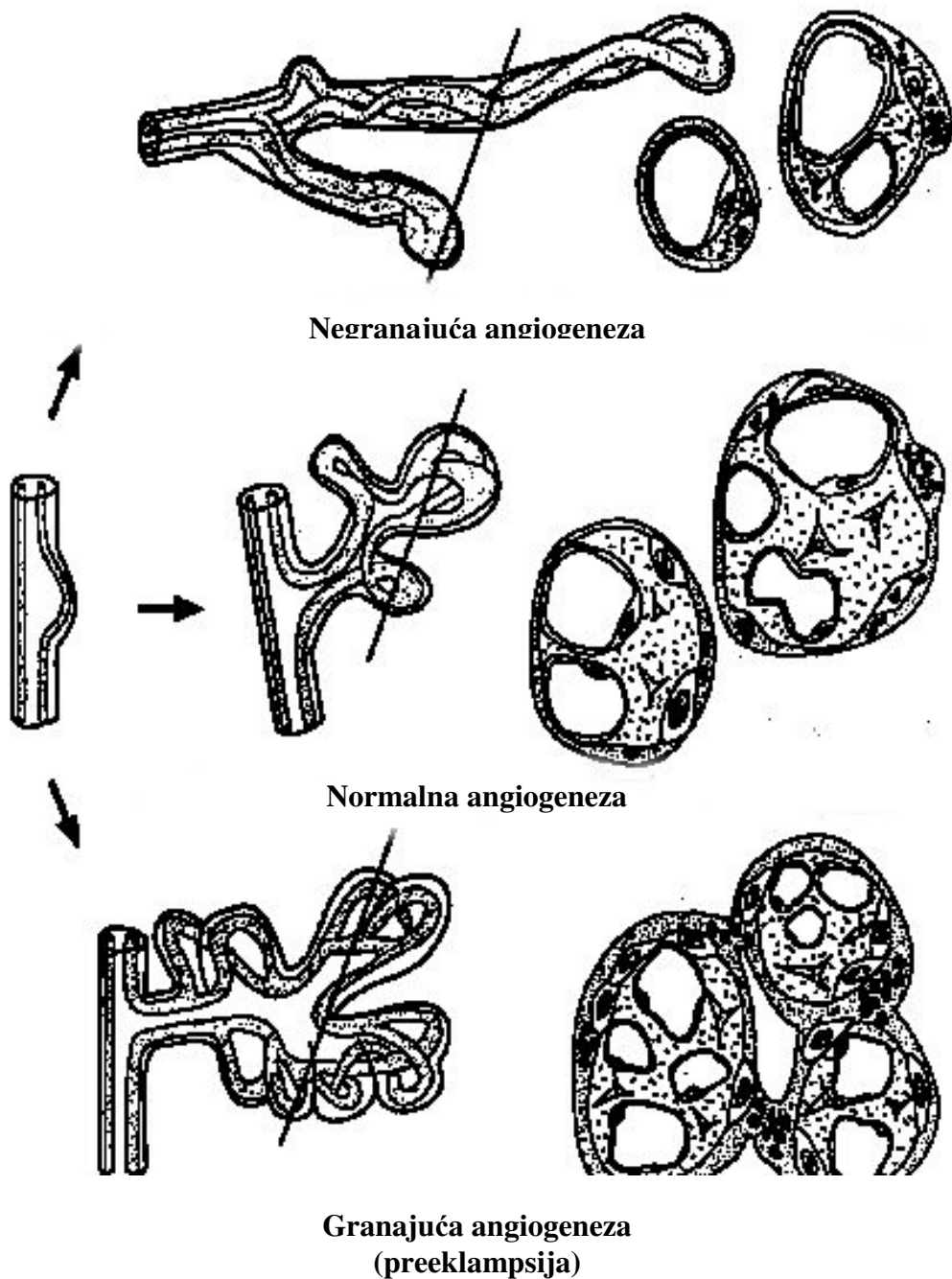
Slika 9. Dobro promijenjena žila miometrija  
(Utero placentalna krvna žila u miometriju koja pokazuje adekvatnu fiziološku promjenu, H-E x 160)

Rani razvoj placente nastaje u uvjetima hipoksije, što dovodi do stimulacije proliferacije citotrofoblasta, a inhibira invaziju trofoblasta (33). Pravi protok krvi se uspostavlja između 10.-12. tjedna trudnoće. Povećava se  $pO_2$  i dolazi do invazije trofoblasta i do promjena spiralnih arterija, što dovodi do smanjenja otpora u placenti. Visoka razina kisika dovodi do usporenja angiogeneze. Hipoksija dovodi do smanjenja PIGF mRNA i proteina. PIGF-1 stimulira trofoblastnu DNA sintezu u prvom tromjesečju i povećava broj stanica, dok PIGF-2 nema taj efekt. Stimulacija s PIGF-1 nema utjecaja na rast i proliferaciju endotela, dok viša koncentracija PIGF-2 inhibira njihov rast. U trudnica s preeklampsijom oksigenacija majke je uredna, ali zbog oštećenja uteroplacentalne cirkulacije placenta i fetus su hipoksični. U tim uvjetima se povećava VEGF, a smanjuje PIGF.

Korelacija vrijednosti PIGF seruma majke i umbilikalne vene potvrđuje hipotezu da PIGF ima utjecaj na razvoj uteroplacentalnih krvnih žila majke kao i na fetalni razvoj krvnih žila (tablica 3).

Tri različita tipa hipoksije mogu nastati.

1. Preplacentarna hipoksija. Majka, placenta i fetus su hipoksični. Nastaje kod anemije majke i srčanih bolesti majke. U uvjetima preplacentarne hipoksije dolazi do nastanka granajuće angiogeneze sa stvaranjem kratkih terminalnih resica.
2. Uteroplacenta hipoksija. Oksigenacija majke je uredna, ali zbog oštećenja uteroplacentne cirkulacije placenta i fetus su hipoksični kao u preeklampsiji s održanim dijastoličkim protokom. U ovim uvjetima periferne placentne resice slično pokazuju stvaranje bogato grananje, fetalni protok je uredan ili smanjen. U tim uvjetima se povećava VEGF, a smanjuje PlGF.
3. Postplacentarna hipoksija. Fetus je hipoksičan, majka je dobro oksigenizirana, placenta pokazuje viši  $pO_2$  od normale. U ovim uvjetima terminalne kapilare se slabije razvijaju nedostaje grananje kapilara što dovodi do povišenja otpora. Perinatalni mortalitet je visok, a preživjela novorođenčad razvijaju neurorazvojna oštećenja. U ovim uvjetima PlGF je povišen, a VEGF je smanjen što ukazuje na rano započetu hiperoksiju. Postplacentarna hipoksija rezultira dominirajućim djelovanjem PlGF u ranoj trudnoći, smanjenjem razvoja granajuće angiogeneze i reduciranim stvaranjem terminalnih resica.



Slika 10. Prikaz tipova angiogeneze

Osim toga što ju opskrbljuje cirkulacija majke, placenta čovjeka sadrži krvne žile koje su po svom podrijetlu u potpunosti fetalne i nastavljaju se na krvne žile fetusa u razvoju. Fetalnoplacentarne krvne žile nalaze se u korionskim resicama koje oplahuje majčina krv, i ova neposredna blizina dopušta učinkovitu izmjenu otopljenih tvari i plinova između majčinske i fetalne cirkulacije bez njihova ispreplitanja. Ovakvo rješenje omogućava razvoj,

rast i pregradnju fetoplacentarnih krvnih žila prema potrebi fetusa, no istovremeno ih čini osjetljivima na promjene s obje, i majčinske i fetalne, strane placente. Svaka patološka promjena hemodinamskih obilježja majke, svojstava majčinske krvi (poput hipoksije ili hiperglikemije) ili među faktorima rasta, uključujući vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), citokine i medijatore upale, može imati neposredan utjecaj na rast, održavanje i funkciju fetoplacentarnih krvnih žila.

Diabetes mellitus (DM) dokazano je povezan s ubrzanom mikroangiopatijom (u okviru dijabetične retinopatije, nefropatije i neuropatije), a ovo pak može biti povezano s hipertenzijom i promjenama u permeabilnosti kapilara. Dijabetični milieu uključuje hipoksiju, hiperglikemiju, povišen vaskularni endotelni faktor rasta (tablica 4), slobodne radikale kisika, završne proizvode glikozilacije, citokine i medijatore upale. Za ove se faktore zna da oštećuju funkciju endotelne barijere ili da imaju izrazit angiogeni učinak. U stvari, pojačana angiogeneza uobičajeno je obilježje dijabetične vaskulopatije, posebno kod dijabetičnih komplikacija u okviru proliferativne retinopatije (3).

Majčinski DM združen je s povećanjem morbiditeta i mortaliteta tijekom embrionalnog, fetalnog i perinatalnog perioda. Među brojnim abnormalnostima cijeli je niz kardiovaskularnih problema koji zahvaćaju potomka dijabetičnih majki. Krvožilni sustav je prvi organski sustav koji se razvija, i njegovo javljanje potiče razvoj drugih organa, i povezano s time, organotipsku diferencijaciju njihovih vlastitih vaskularnih osnova. Jednako tako kao što je diferencijacija organa tijekom embriogeneze potpomognuta fetalnom vaskularnom morfogenezom, tako su placentaran rast i diferencijacija potpomognuti uspostavom fetoplacentarnog krvožilnog sustava. Doista, tijekom cijele trudnoće, povećane potrebe rastuće fetalne mase povezane su s trajnom prilagodbom strukture i funkcijskog kapaciteta placente i njene fetalne vaskularne osnove. Naglasak ovog istraživanja je na događajima koji oblikuju fetoplacentarne krvne žile, te na promjenama koje se javljaju kao posljedica majčinskog dijabetesa.

Vaskulogeneza fetoplacentarnih krvnih žila odvija se tijekom prvog mjeseca trudnoće za vrijeme kada matične stanice izvanembrionalnog mezoderma invadiraju korionske resice u nastajanju. Ispitivanja ultrastruktura na placenti macaque majmuna i placenti čovjeka (163,24,164) pomogla su identifikaciji slijeda događaja. Mezenhimalne matične stanice raspoređuju se u nakupine hemangioblasta unutar kojih su unutrašnje stanice hematopoetske

dok vanjske stanice (angioblasti) postaju endotelne stanice. Širenje parastaničnih pukotina između pred-endotelnih stanica čini se da je glavni mehanizam stvaranja lumena kod ovih preteča krvnih žila (164,162). U nastavku, vaskularni pleksus nastaje spajanjem, grananjem i anastomoziranjem cjevčica (165) no potpuno funkcionalan optok uspostavlja se tek nakon spajanja na vaskulaturu fetusa.

Angioblasti i hematopoetske stanice diferenciraju se pod utjecajem vaskularnog endotelnog faktora rasta A (VEGF-A ili VEGF) i faktora rasta fibroblasta (FGFs). Oba tipa stanica ekspimiraju receptor VEGFR-2 (KDR/flk-1) čiji je ligand VEGF. VEGFR-2 glavni je medijator mitogenih, angiogenih te učinaka VEGF koji povećavaju permeabilnost. Glavna uloga ovog receptora dokazana je izostankom vaskulogeneze i izostankom stvaranja krvnih otočića i organiziranih krvnih žila u Flk-1-nula miševa, što dovodi do smrti in utero između dana 8.5 i 9.5 (75). VEGFR-2-pozitivne stanice također dovode do pojave progenitora perivaskularnih stanica, što uključuje pericite i vaskularne stanice glatkih mišića. VEGFR-2 podliježe VEGF-ovisnoj tirozin fosforilaciji i dovodi do indukcije rasta aktivacijom Raf-Mek-Erk puta. Put PI-3 kinaza-Akt medijator je aktivnosti za preživljenje.

Vaskulogeneza i angiogeneza su također djelomično regulirane sa sposobnosti endotelnih stanica da se priljube jedna uz drugu i oblikuju novu krvnu žilu. Receptori za adheziju stanica-matriks i stanica-stanica ovdje imaju važnu ulogu.

Utječe li ili ne DM majke na placentarnu vaskulogenezu u prvom trimestru nije poznato. Kod streptozocinom-induciranih dijabetičkih miševa, i mišjim zametcima uzgajanim u uvjetima hiperglikemije, vaskulopatija žumanjčane vrećice može biti povezana s promjenama u ekspresiji i fosforilaciji trombocitnog endotelnog faktora rasta-1 i VEGF (,173). Sakupljanje eksperimentalnih podataka za prvo tromjesječne vaskulogeneze kod DM majke važan je put za daljnja istraživanja.

Angiogeneza uključuje nastajanje novih krvnih žila iz postojećih i, nakon vaskulogeneze, vodi do pojave primarnih, primitivnih, u nastajanju ili nezrelih kapilarnih mreža, koje se, postupno mijenjaju u zrele mreže. U placenti, ovo se može odvijati u tri faze (162). Prva faza (4-25 tjedana gestacije), granajuća angiogeneza prevladava unutar resica. Dalje (15-32 tjedna), neki periferni kapilarni pleksusi čine se da regrediraju napuštajući resice s centralnim matičnim krvnim žilama (arterije i vene). Le Noble et al. 2004.g. pokazali su da tijekom arteriovenske diferencijacije u žumanjčanoj vrećici, krvne žile malog promjera

arterijskih područja selektivno se odvajaju od rastućih arterijskih stabala i spajaju na venski sustav (174). Ostaje za vidjeti pridonosi li ovaj mehanizam očitaj kapilarnoj regresiji u placentarnim resicama. Naposlijetku, (25 tjedana do termina), stvaraju se terminalne kapilarne petlje kao dio pomaka prema velikoj ne-granajućoj angiogenezi. Ovi događaju određuju vaskularizacijski indeks resica. Na primjer, od 10-21 tjedana (za vrijeme faze granajuće angiogeneze), omjeri duljine kapilare : resice rastu do vrha od oko 4:1. Oni naglo padaju tijekom faze kapilarne regresije prije no što postupno ponovo ne dođu do vršnih vrijednosti pred kraj završne faze ne-granajuće angiogeneze (175).

Endotelne cijevčice oblikovane vaskulogenezom transformiraju se u primitivne kapilarne mreže putem granajuće angiogeneze. Nove grane i segmenti nastaju na dva glavna načina koja se odvijaju posebno, međusono odvojeno, ili zajedno (176,177). Prvi mehanizam je angiogeneza pupanjem/nicanjem i uključuje razvoj lateralnih pupova/izdanaka iz postojećih krvnih žila. Drugi mehanizam je angiogeneza 'rascijepanjem' i uključuje transkapilarne endotelne tračke koji dijele lumen krvne žile na dva ili više lumena. Daljnji radovi su potrebni kako bi se utvrdili doprinosi ovih alternativnih vrsta granajuće angiogeneze. U najmlađim (mezenhimalnim) resicama, granajuća angiogeneza dešava se rijeđe od ne-granajuće angiogeneze i kapilarne mreže su slabo razvijene. No, nastavkom trudnoće, stimulirana je granajuća angiogeneza i primitivna kapilarna osnova transformira se u gustu mrežu ispod trofoblasta.

Ekspresija VEGF i VEGFR-2 najintenzivnija je rano u gestaciji i naglo pada kako trudnoća napreduje (67,178,179,167,180,181,165). Naše istraživanje je pokazalo značajno više vrijednosti VEGF između 27 – 31 tjedna trudnoće u dijabetičnih trudnica u odnosu na kontrolnu skupinu ( $16,871 \pm 2,121$ ;  $20,744 \pm 4,9631$ ;  $p < 0,05$ ).

Suprotno tome, ekspresija PlGF i topljivog VEGFR-1 je veća prema terminu kako učestalost ne-granajuće angiogeneze raste (tablica 6) što su dokazali i drugi autori (167,94,181,161,162). Za oba tipa granajuće angiogeneze čini se vjerojatnim da je regulacija pod utjecajem VEGF i njegovih receptora zajedno s Ang-1 i Ang-2 i njihovim receptorom Tie-2 (Tek). Uloga PlGF u granajućoj spram negranajuće angiogenezi je nesigurna.

Kao dio vaskularnog preoblikovanja i stabilizacije, pokritost krvnih žila perivaskularnim stanicama također se mijenja. Kod 8-12 tjedana (rana angiogeneza), manje od 40% fetoplacentarnih krvnih žila vezano je uz perivaskularne stanice, no ovaj odnos se

povećava na oko 63% do termina (182). Je li ovaj omjer promijenjen u dijabetičnoj ljudskoj placenti nije poznato. U dijabetičnoj mišjoj retini broj pericita smanjuje se za 50% (183) i može doprinijeti patogenezi proliferativne dijabetičke retinopatije.

Od oko 25 tjedana trudnoće dolazi do pomaka od stvaranja debala i glavnih grana viloznih stabala prema nastajanju finijih grana na periferiji. U ovom kontekstu, rast krvnih žila se pomiče više prema negranajućoj angiogenezi i ovo prati razvoj zrelih srednjih resica (mature intermediate villi, MIV) na periferiji. MIV su duge ( $> 1000 \mu\text{m}$ ) i tanke ( $80\text{-}120 \mu\text{m}$ ) i pružaju utočište 1-2 slabo granate kapilarne petlje (162). One pokazuju relativno niske razine proliferacije trofoblasta, no veću razinu endotelne proliferacije. Iako navodi na pomisao proliferativne elongacije (161), rast također može uključivati interkalacijsku elongaciju, gdje se cirkulirajuće endotelne progenitorske stanice nakupljaju u postojećem vaskularnom endotelu. Diferencijalnim rastom viloznih kapilara nastaju TV sa zavijenim kapilarama koje ulaze u nadležeci trofoblast. Postoje glavna mjesta za izmjenu plinova i prehrambenih tvari između majke i fetusa pasivnom difuzijom. Obično kapilarne petlje od 5-20 TV povezane su serijski elongiranim kapilarama pojedinog MIV. S napredovanjem trudnoće, terminalne kapilare žarišno se dilatiraju u sinusoide ( $> 40 \mu\text{m}$  promjer) što može donekle kompenzirati štetne učinke na ukupni vaskularni otpor stvaranja duljih kapilarnih petlji (180,162).

Molekularne promjene prate ove morfološke događaje. Ekspresija VEGF i VEGFR-2 manje je intenzivna nego ranije u trudnoći (67,179,178,167,180,181) dok je ekspresija VEGFR-1 i PlGF veća (166,181). PlGF je eksprimiran u sinciciotrofoblastu (168,50) i mediji većih matičnih krvnih žila (101,113). Pomak uzorka ekspresije angiopoietina tijekom trudnoće odražava akviziciju većih nezrelih resica koje sadrže diferencirane krvne žile (arterije i vene) zajedno s MIV i TV u razvoju koji sadrže nezrele krvne žile. Ang-1 (koji stabilizira krvne žile i ograničava permeabilnost) nalazi se u većini fetalnih krvnih žila, ali ga najintenzivnije eksprimiraju velike arterije. Suprotno tome, Ang-2 (Ang-1 antagonist) prisutan je u TV i, u manjoj mjeri, u velikim krvnim žilama (164). Ekspresija Ang-2 mRNA pada oko 10-puta tijekom gestacije (180). Povezana s promjenama stabilnosti krvnih žila i zrelosti resica su povećanja u postotku krvnih žila koje su privukle perivaskularne stanice (181).

Poremećaj funkcionalnih molekula komplikacija je DM u retinopatiji (172). Isto čini se vrijedi za fetoplacentarne krvne žile u pregestacijskom DM (tip 1 i 2) i u gestacijskom dijabetesu (GDM). Kod DM tipa 1 (184), preko 50% placentarnog mikrokrvožilja pokazuje



potpun gubitak VE-kadherina i  $\beta$ -katenina zbog njihova gubitka s određenih mikrodomena (tj. junkcionalnih regija) prije nego zbog gubitka ukupnog proteina. Ovo pražnjenje povezano je s povećanom fosforilacijom ovih molekula kao i s povećanjem proporcija krvnih žila s junkcionalnom fosfotirozinskom imunoreaktivnosti. Neposredan funkcionalna posljedica ovih promjena je veća ekstrasvazacija 'tracera' (pratećih molekula) (dekstrana veličine 76 kDa) koji se, u normalnim trudnoćama, zadržavaju u vaskularnom odjeljku placentarnih krvnih žila. Ovo predlaže da su, u DM tipa 1, placentarne krvne žile, poput onih retine, propusne.

Razine VEGF su povišene u tipa 1 dijabetičnim placentama (tablica 5) i ovo može biti djelomično odgovorno za fosforilaciju i gubitak adhezijskih molekula s AJs. In vitro, VEGF-inducirana tirozinska fosforilacija VE-kadherina i  $\beta$ -katenina može dovesti do razbijanja grupa ovih molekula i povećane permeabilnosti za makromolekule (169,171, 185). Ovo zapažanje pojačava ideju da povećane razine VEGF pridonose poremećajima opaženima u tipa 1 dijabetičnim placentama. Iako su signalna svojstva VE-kadherina i  $\beta$ -katenina uglavnom inducirana VEGF-om (170), razine drugih angiogenih faktora rasta, poput npr. PlGF, FGF-2, Ang-1 i Ang-2, također mogu utjecati na razvoj krvnih žila i zrelost u dijabetičnoj placenti i potrebno ih je pratiti.

U GDM (koji zahvaća kasniju polovicu trudnoće, poštedjevši tako razvojne faze vaskulogeneze i rane angiogeneze), slika je manje jasna budući da postoje funkcionalni poremećaji (186) te dokazi i za i protiv pojačane angiogeneze (187,186). Istraživanja uz upotrebu trodimenzionalne tehnike vizualizacije izvijestila je o pojačanom longitudinalnom rastu fetoplacentarnih krvnih žila i pojačanoj granajućoj angiogenezi u GDM (187). Intolerancija glukoze kod GDM obično je blaga, no ona ipak znači veću učestalost komplikacija tijekom trudnoće i povećan perinatalni mortalitet i morbiditet novorođene djece. Rana ispitivanja placenti GDM majki otkrila su da je postojala značajno veća površina za izmjenu između majke i fetusa, s obzirom na površinu perifernih resica i kapilara, te veći volumen međuviloznog prostora (188). Ove strukturne promjene protumačene su kao uspješna prilagodba metaboličkim poremećajima majke. Status permeabilnosti ovih krvnih žila nije poznat.

Doplerska ispitivanja pokazala su da se fetalni vaskularni otpor smanjuje tijekom normalne trudnoće pri čemu kod kompliciranih trudnoća može doći do poremećaja (189). Budući da ovdje nema autonomne inervacije, protok krvi u vaskulaturi koja sazrijeva mora

biti reguliran lokalnim vazoaktivnim efektorima i kombinacijom fizioloških prilagodbi (perfuzijskog tlaka i vaskularnog otpora) i anatomskih promjena (u dimenzijama krvnih žila ili prostornom uređenju). U osnovi, ovo kasnije uključuje nastanak ili nekoliko dugih krvožilnih segmenata ili mnogo kratkih. Kod jedne uniformne krvne žile, otpor protoku krvi je izravno proporcionalan njenoj duljini, i obrnuto proporcionalan kvadratu površine na presjeku. Štoviše, ukupni otpor ( $R_t$ ) paralelno smještenih multiplih segmenata krvne žile manji je od parcijalnog otpora bilo kojeg pojedinačnog segmenta ( $1/R_t = 1/R_1 + 1/R_2 + 1/R_3 + \dots 1/R_n$ ), dok je ukupni otpor serijskog uređenja suma pojedinačnih otpora ( $R_t = R_1 + R_2 + R_3 + \dots R_n$ ). Budući da su druge varijable konstantne, slijedi da paralelno uređenje krvnih žila ima prednost pred serijskim jer ono stvara multiple segmente manje prosječne duljine i stoga manjeg sveukupnog otpora.

Mogućnost izbora za minimizaciju duljine segmenta i otpora je granajuća angiogeneza. Iako oboje i angiogeneza pupanjem/nicanjem i angiogeneza 'rascijepanjem' stvaraju vaskularno uređenje s brojnim, ali relativno kratkim, krvožilnim segmentima, angiogeneza 'rascijepanjem' (177) je ekonomičnija (zahtijeva manje endotelne proliferacije) i univerzalnija (doprinosi nekoliko aspekata vaskularne morfogeneze). Suprotno grananju, ngranajuća angiogeneza uključuje produljenje postojećih krvožilnih segmenata i dovodi do povećanog otpora protoku. Do produljenja može dolaziti proliferacijom postojećih endotelnih stanica ili interkalacijom endotelnih progenitorskih stanica ili kombinacijom proliferacije i interkalacije.

Na temelju ovih razmišljanja razumno je anticipirati da bi fetoplacentarne krvne žile rasle prvenstveno na način granajuće angiogeneze. U stvari, one rastu mješavinom granajuće i ngranajuće angiogeneze, a održane su i u dijabetičnoj placenti. Pojačana fetoplacentarna angiogeneza u DM nije praćena promjenama u promjeru lumena kapilara ili njihovom obliku presjeka, sugerirajući da nema vaskularne pregradnje van one viđene u nedijabetičnim kontrolama. Dakle, vjerojatno je također da je prosječna površina koju zauzimaju endotelne stanice sačuvana u DM i da stoga do povećanja duljine i volumena kapilara dolazi prije proliferacijom no pregradnjom endotelnih stanica (190,191). Iako se ovo ne može dosljedno naći u svim tipovima DM, indeksi vilozne vaskularizacije mogu biti veći u dijabetičnim trudnoćama, no čini se da je ovo neovisno o prisustvu i dr. dijabetičnih komplikacija (retinopatija, nefropatija).

Morfometrička ispitivanja na ispitanicima s tipom 1 DM pokazala su da do povećane fetoplacentarne angiogeneze može doći i usprkos dobroj kontroli glikemije i razina glikoziliranog hemoglobina HbA<sub>1c</sub> (192,193,190,194,191,184). DM je sindrom i, sukladno tome, faktori u pozadini hiperglikemije mogu utjecati na vaskularne promjene koje vidimo, uključujući inzulinsku terapiju. Kronična hipoksija može biti djelomično odgovorna za povećanu angiogenezu i prevladavanje krvnih žila uzrokovano VEGF-om što je nađeno u našem istraživanju (tablica 3). Hipoksija je poznata kao jedan od uzroka lokalnog porasta VEGF-a, u DM, nalazimo dokaz fetalne hipoksije. Prilagodbe u placentalnom transportu kisika zahvaćaju prvenstveno fetalni kapilarni sustav (195). Osim toga, majčinski hematokrit je normalan, ali nalazimo povišene fetalne hematokrite, koncentracije hemoglobina i razine eritropoeze (195,190,194,196). Eritropoetin regulira eritropoezu tijekom fetalnog života, a smanjen tlak kisika neposredan je podražaj za njegovu produkciju (197,198). Sam eritropoetin posjeduje angiogena svojstva (199). Vilozni trofoblast vrši sekreciju eritropoetina, a njegov receptor nalazimo na trofoblastu i endotelu fetalnih krvnih žila (200). Štoviše, placenta može postati važan izvor eritropoetina u slučajevima fetalne hipoksije (201).

Među posljedicama hiperglikemije nalaze se neenzimatska glikozilacija proteina i stvaranje završnih proizvoda glikozilacije. Pretjerana glikozilacija izvanstaničnog matriksa, koja nastaje izlaganjem kultura endotelih stanica umbilikalne vene visokim koncentracijama glukoze, može objasniti poremećaj u adheziji pericita (202). AGEs povećavaju ekspresiju VEGF u retini štakora, i djeluju sinergistički s hipoksijom (203). AGE receptori su prisutni na cijelom nizu stanica uključujući stanice endotela, perivaskularne stanice i makrofage. AGEs su toksični za pericite, i pokazalo se da glikozilirani albumin inducira angiogenezu, no krvne žile u nastanku deficitne su za pericite (204). Ovo pomanjkanje može stimulirati proliferaciju endotela (205) i dovesti do stvaranja krvnih žila koje su plastičnije (manje zrele) i permeabilnije.

Morfološki i molekularni nalazi sugeriraju da u DM do povećane vaskulogeneze i angiogeneze može doći nakon hiperglikemijskih epizoda u ranim fazama trudnoće dok je tlak kisika nizak, a ekspresija VEGF povećana. Ovo bi bilo u skladu s povišenim razinama FGF-2 i VEGFR-1 koje nalazimo u vaskulogenezi. Hiperglikemija također može imati izravan toksični učinak na pericite i djelovati na njihovu adheziju za bazalnu laminu i, na taj način, asocijaciju s endotelnim stanicama. Od ovih događaja bi se očekivalo da odgode stabilizaciju kapilara u nastanku. Nakon drugog tromjesečja trudnoće, učinak visoke glukoze mogao bi biti

manji, budući da faza poviše razine kisika i PlGF, zajedno sa smanjenom ekspresijom VEGF, dovode do negranajuće angiogeneze.

Učinci DM vidljivi su na mnogim organskim sustavima i uključuju krvožilne abnormalnosti retine i bubrega, kao i fetusa i placent. Ipak, preporuča se oprez prilikom ekstrapolacije događaja angiogeneze s jednog organskog sustava na drugi, budući da odgovor na DM može varirati među pojedinim organima (206). Pojačana angiogeneza događa se u dijabetičnoj retinopatiji i nefropatiji, dok do smanjenja angiogeneze dolazi kod embrionske vaskulopatije, nedovoljnog razvoja kolaterala koronarnih arterija i smanjenog kapaciteta za cijeljenje rana.

Hipoksija povećava VEGF i, doista, razine VEGF su povišene u bolesnika s dijabetičnom retinopatijom i nefropatijom (207). Drugi faktori koji povećavaju VEGF uključuju hiperglikemiju, citokine (npr. TGF- $\beta$ ) i faktore rasta (npr. FGF-2, PDGF). Kod dijabetične retinopatije, na primjer, nalazimo povišene razine FGF i neovaskularizacija ovisi o odvajanju pericita od bazalne lamine i vaskularnog endotela (206,209). Kasnije, endotelne stanice vrše sekreciju PDGF koji stimulira nakupljanje pericita i aktivira TGF- $\beta$  koji stabilizira krvne žile u nastanku inhibicijom endotelne proliferacije, poticanjem diferencijacije perivaskularnih stanica i proizvodnjom molekula bazalne lamine i stanične adhezije (210,209). Ang-1 je također uključen u proces stabilizacije krvnih žila i otpora 'curenju', ali niske razine napona kisika povećavaju razinu njegova antagonista, Ang-2 (211,209). Ukupna međuigra između ovih faktora rasta i signalizacije u okviru različitih puteva rasta, proliferacije i preživljenja diktirati će razvoj zrele vaskularne podloge, koja je sposobna regulirati prijenos otopljenih tvari sukladno zahtjevima tkiva kojima služi. Ovo nigdje nije važnije do na materno-fetalnom sučelju, odnosno ljudskoj placenti, koja je razvijena isključivo za održavanje fetalnog rasta.

Inzulinu slični čimbenici rasta imaju značajnu ulogu u kontroli rasta i sazrijevanja kako fetusa tako i placent. Snabdijevanje ploda putem placent osnovnim supstratima kao što su kisik i prehrambene tvari s jedne strane određuje, izravno i neizravno, maksimum do kojega fetus može rasti, a s druge strane održava već formirana tkiva. Ograničena prehrana majke također mijenja i strukturu placent. Ograničena prehrana majke smanjuje placentu, uslijed čega dolazi do zaostajanja u rastu ploda i smanjenog kapaciteta razmjene tvari. Grafikon 4. i tablica 6. prikazuju srednje vrijednosti IGF-II tijekom trudnoće u istraživanim skupinama. Vrijednosti su više u skupini trudnica s dijabetesom i povećavaju se tijekom

trudnoće, ali nema statističke značajnosti. Vrijednosti IGF-II u trudnica s diabetesom kreću se 334,213 do 598,04 pg/mL, a u zdravih trudnica od 280,517 do 537,17 pg/mL.

Razina IGF-II u umbilikalnoj veni trudnica s dijabetesom je 199,35 pg/ml, a u zdravih trudnica 168,2 pg/mL i nema statističke značajnosti. Ovi nalazi u skladu su s pretpostavkom da sistemski IGF-II u majci pospješuje rast placente i diferencijaciju u prvoj polovici trudnoće kada trofoblast prodire u deciduu. Julie Owens (135) istraživala je o različitim posljedicama placentarne restrikcije na razinu fetalnog IGF-I i na rast fetusa. Endokrini odgovor fetusa na obilje supstrata u njegovu okruženju djelomično odražava djelovanje snabdjevenosti supstratima na rast fetusa i njegov metabolizam. Među glavnim anaboličkim hormonima zaduženim za rast in utero su i inzulinu slični čimbenici rasta (IGF), inzulin i hormon tiroidne žlijezde, dok su glavni katabolički hormoni kateholamini i kortizol.

## 6. ZAKLJUČCI

Vrijednosti PIGF progresivno rastu od početka trudnoće do 31. tjedna trudnoće, kada su nađene najviše vrijednosti - razina PIGF između 27 -30 tjedna trudnoće. Vrijednosti nisu statistički značajne u istraživanim skupinama.

Vrijednosti VEGF tijekom trudnoće su više u trudnica s diabetesom u odnosu na zdrave trudnice, ali statistički znakovita razlika između istraživanih skupina je nađena između 27-31 tjedna trudnoće i neposredno nakon poroda.

Vrijednosti VEGFR-1 su više u trudnica s diabetesom u odnosu na zdrave trudnice ali nisu statistički značane razlike.

Vrijednosti IGF su više u skupini trudnica s diabetesom u odnosu na zdrave trudnice i povećavaju se tijekom trudnoće, ali nema statističke značajnosti.

Opći podaci, dob trudnice, tjedni dovršenja trudnoće, težina placente, novorođenačka težina i Apgar index u istraživanim skupinama nemaju statističke značajnosti.

Razine PIGF pokazuje korelaciju u tjednima trudnoće, porodnoj težini i težini placente u trudnica s diabetesom i zdravih trudnica.

Vrijednosti PIGF u umbilikalnoj veni su niže u odnosu na razinu PIGF seruma majke. Uspoređujući vrijednosti PIGF seruma majke i vene umbilikalis dobiven je pozitivan i statistički signifikantan koeficijent.

Karakteristike ležišta placente u trudnica dobivenih kod poroda dovršenih carskim rezom su 17% nepotpune fiziološke promjene. Karakteristike ležišta placente, fiziološke promjene u odnosu na nepotpune fiziološke promjene su statistički značajne u odnosu na tjedne dovršenja trudnoće, težine placente i novorođenčadi, razine PIGF u majčinom i UV seruma.

Najviše razine VEGF su nađene u prvih 15 tjedana trudnoće, trudnica s dijabetesom 24,42 pg/ml i zdravih trudnica 23,52 pg/mL. Nađene su više vrijednosti VEGF u dijabetičnih trudnica tijekom trudnoće, ali statistički znakovita razlika između istraživanih skupina je nađena između 27-31 tjedna trudnoće, trudnica s dijabetesom 20,74 pg/ml i zdravih trudnica 16,871 pg/mL i neposredno nakon poroda, trudnica s diabetesom 23,18pg/ml i zdravih trudnica 18,38 pg/mL.

Vrijednosti VEGF-1 su više u trudnica s dijabetesom u odnosu na zdrave trudnice. Vrijednosti u 27-31 tj. su niže, u trudnica s diabetesom 712,14 pg/mL i zdravih trudnica

690,72 pg/mL tada rastu do poroda u trudnica s dijabetesom 1543,84 pg/mL i zdravih trudnica 1278,04 pg/mL i nema statističke značajnosti, kao ni u razinama VEGF-1 u umbilikalnoj veni.

Vrijednosti IGF-II su više u skupini trudnica s dijabetesom i povećavaju se tijekom trudnoće, ali nema statističke značajnosti. Vrijednosti IGF-II u trudnica s dijabetesom kreću se 334,21 pg/ml do 598,04 pg/mL, a u zdravih trudnica od 280,517 do 537,17 pg/mL. Razina IGF-II u umbilikalnoj veni trudnica s dijabetesom je 199,35 pg/ml, a u zdravih trudnica 168,2 pg/mL i nema statističke značajnosti.

## 7. SAŽETAK

Šećerna bolest je sindrom koji nastaje zbog apsolutnog ili relativnog manjka ili promjenjenog djelovanja inzulina, a rezultat je hiperglikemija. Dijabetes u trudnoći donosi brojne probleme kako za majku tako i za dijete. Dijabetični milje uključuje hipoksiju, hiperglikemiju i može utjecati na rast održavanje i funkciju fetoplacentarnih krvnih žila, angiogenezu. Bilo koja patološka promjena hemodinamskih obilježja majke, svojstva majčinske krvi, te čimbenici rasta uključujući: vaskularni endotelni čimbenik rasta VEGF, placentni čimbenik rasta PlGF, inzulinu slični čimbenik rasta IGF, slobodni radikali kisika, završni proizvodi glikolizacije, citokini i medijatori upale zna se da oštećuju funkciju endotelne barijere ili imaju izrazit angiogeni učinak.

Naglasak ovog istraživanja je na događajima koji oblikuju fetoplacentnu vaskulaturu, te na promjenama koje se javljaju kao posljedica majčinskog DM.

Ciljevi istraživanja su odrediti razinu PlGF, VEGF i IGF u istraživanim skupinama, histološki analizirati ležište placente i usporediti sa vrijednostima PlGF u odnosu na potpunu, nepotpunu ili izostalu pretvorbu krvnih žila, te usporediti čimbenike rasta u serumu majke i umbilikalnom serumu i naći korelaciju između težine placente, težine novorođenčadi i razine pojedinih čimbenika rasta.

Materijali i metode: studija je prospektivna, 42 trudnice s dijabetesom tipa 1, a kontrolnu skupinu čine 34 zdrave trudnice. Uzimani su uzorci krvi kod trudnica u razmacima 3-4 tjedna tijekom trudnoće kod redovnih pregled, kod poroda i iz umbilikalne vene. Iz seruma su određivani, VEGF, PlGF i IGF-2. Kod poroda dovršenih carskim rezom učinjena je biopsija ležišta posteljice i histološki obrađivana. Zabilježen je i način dovršenja poroda, porodna težina, dužina novorođenčadi, Apgar index, pH i acidobazni status iz umbilikalne vene. Učinjena je statistička obrada po SPSS programu.

### Rezultati

Vrijednosti PlGF progresivno rastu od početka trudnoće do 31. tjedna trudnoće, kada su nađene najviše vrijednosti - razina PlGF između 27 -30 tjedna trudnoće. Vrijednosti nisu statistički značajne u istraživanim skupinama.

Vrijednosti VEGF tijekom trudnoće su više u trudnica s dijabetesom u odnosu na zdrave trudnice, ali statistički znakovita razlika između istraživanih skupina je nađena između 27-31 tjedna trudnoće i neposredno nakon poroda.



Vrijednosti VEGFR-1 su više u trudnica s diabetesom u odnosu na zdrave trudnice ali nisu statistički značane razlike.

Vrijednosti IGF su više u skupini trudnica s diabetesom u odnosu na zdrave trudnice i povećavaju se tijekom trudnoće, ali nema statističke značajnosti.

Opći podaci, dob trudnice, tjedni dovršenja trudnoće, težina placente, novorođenačka težina i Apgar index u istraživanim skupinama nemaju statističke značajnosti.

Razine PIGF pokazuje korelaciju u tjednima trudnoće, porodnoj težini i težini placente u trudnica s diabetesom i zdravih trudnica.

Vrijednosti PIGF u umbilikalnoj veni su niže u odnosu na razinu PIGF seruma majke. Uspoređujući vrijednosti PIGF seruma majke i vene umbilikalis dobiven je pozitivan i statistički signifikantan koeficijent.

Karakteristike ležišta placente u trudnica dobivenih kod poroda dovršenih carskim rezom su 17% nepotpune fiziološke promjene. Karakteristike ležišta placente, fiziološke promjene u odnosu na nepotpune fiziološke promjene su statistički značajne u odnosu na tjedne dovršenja trudnoće, težine placente i novorođenčadi, razine PIGF u majčinom i UV seruma.

Zaključak: Ističem veliku važnost redovnog praćenje normoglikemije kod trudnica s dijabetesom koja rezultira minimalnim oscilacijama hiperglikemije i hipoglikemije a time i hipoksije, kao i nadzor raznih patoloških stanja u trudnoći (hipertenzija i dr.) koji utječu na čimbenike angiogeneze placente a time i na pojavnost specifičnog morfološkog izgleda placente u trudnica s dijabetesom tipa I .

## 8. SUMMARY

Diabetes is a syndrome which develops because of absolute or relative deficiency of insulin or because of its alternated way of acting, which results in a formation of hyperglycemia. Diabetes in pregnancy brings along numerous other problems for both a mother and a child. Diabetes includes hypoxia, hyperglycemia and may affect grow, preservation and function of fetoplacental blood vessels, angiogeneses. Any form of pathological changes of haemodynamic characteristics in mother, characteristics of maternal blood, and grow factors including: vascular endothelial grow factor VEGF, placental grow factor PIGF, insulin like grow factor IGF, free oxygen radicals, final products of glycolysation, cytokines and mediators of inflammation are known to damage function of endothelial barrier or have extreme angiogenic effect.

Emphasis of this research is on the events which form fetoplacental vasculature, and the changes which result as a consequence of mothers diabetes mellitus (DM).

Goal of this research is to determine levels of PIGF, VGEF and IGF-II in examined groups, to perform histopathological analysis of placental insertion and to compare it with PIGF values in complete, incomplete and absent transformation of blood vessels, to compare grow factors in a serum of a mother and umbilical serum, and to find a correlation between the weight of the placenta, newborn's weight and a level of individual grow factors.

Materials and methods: this is a prospective study, which involves 42 pregnant women with a type 1 diabetes, while a control group consists of 34 healthy pregnant women. Blood samples were taken from pregnant women at regular examinations, in periods of 3 to 4 weeks during whole pregnancy, at the delivery and from the umbilical vein. From the serum VGEF, PIGF and IGF-2 were determined. Deliveries which were terminated with a C-section, a biopsy of placental bed was made and it was send for a histopathological examination. Type of the childbirth termination, newborn's weight, newborn's length, Apgar score, pH and acidobasic status from the umbilical vein were noted. Statistical analysis was performed with SPSS program.

### Results

PIGF values progressively grow from the beginning of pregnancy up to the 31st week of pregnancy, when maximum values – level of PIGF were found between 27 -30 weeks of pregnancy. Values are not statistically significant in investigated groups.

VEGF values during pregnancy are higher in pregnant women who suffered from diabetes than in healthy pregnant women, but statistically significant difference between investigated groups was found in a period of 27-31 weeks of pregnancy and immediately after the delivery.

VEGFR-1 levels are higher in pregnant women with diabetes comparing to healthy pregnant women, but this was not found to be statistically significant.

IGF values are higher in a group of pregnant women with diabetes comparing to healthy pregnant women, and they increase during pregnancy, but again this was not found to be statistically significant.

General information, age of the pregnant woman, week when pregnancy was terminated, weight of the placenta, newborn's weight and Apgar score in investigated groups were found not to be of any statistical significance.

PIGF levels show correlation in weeks of pregnancy, newborn's weight and weight of the placenta in pregnant women with diabetes and in healthy pregnant women.

PIGF levels in umbilical vein are lower than PIGF levels from the mother's serum. Comparing values of the PIGF levels from the mother's serum and from the umbilical vein, a positive and statistically significant coefficient was obtained.

A characteristic of the placental bed obtained from the pregnant women whose pregnancies were terminated by a C-section is that there were 17% of incomplete physiological changes. Characteristics of the placenta insertion, physiological changes comparing to the incomplete physiological changes are statistically significant comparing to the week of pregnancy was it was terminated, weight of the placenta and the newborn, PIGF levels in mother's serum and from the umbilical vein.

Conclusion: I must stress out great importance of regular monitoring of normoglycemia in pregnant women with diabetes, which results in minimal oscillations of hyperglycemia and hypoglycemia and by this in minimal oscillations of hypoxia, and a supervision of different pathological conditions in pregnancy, as well (hypertension etc.) which affect factors of placental angiogenesis, and by this prevalence of specific morphological appearance of the placenta in pregnant women with type 1 diabetes.

## 9. LITERATURA

1. Bischof., P. & Irminger-Finger, I. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2005). 37, 1-16.
2. Cunningham, F. G. (urednik) (2001). *William's Obstetrics*, 21. izdanje, McGraw-Hill, New York.
3. Sander B, Larsen M., Engler C, Lund-Andersen H, Parving HH (1994) Early changes in diabetic retinopathy: capillary loss and blood-retina barrier permeability in relation to metabolic control. *Acta Ophthalmol.*1994;72, 553-559.
4. Strauss, J. F. III & Barbieri, R. L. (urednici) *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology*, (2004). 5. izdanje, poglavlje 11. Elsevier, Philadelphia.
5. Cowell, T. P. Implantation and development of mouse eggs transferred to the uteri of non progestational mice. *J. Reprod. Fertil.*, (1969). 19, 239 - 245.
6. Wilcox A. J., Baird, D. D., Weinberg, C. R. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N. Engl. J. Med.* (1999). 340, 1796 - 1799.
7. Yoshinaga, K. Receptor concept in implantation research. U Yoshinaga, K., Mori, T. (urednici) *Development of preimplantation embryos and their environment*. Alan Liss, (1989).New York.
8. Usadi, R. S.et al. Distribution of pinopodes in secretory phase: A prospective, randomized assessment in healthy, fertile women. *Fertil. Steril.* (2001) 76, S39.
9. Benirschke, K. *The Placenta (2004): Structure and Function*. NeoReviews 5, e252 - e261.Haig, D. Genetic conflicts in human pregnancy. *Quart. Rev. Biol.* (1993) 68, 495.
10. King, A. et al. Functions of human decidual NK cells. *Am. J. Rep rod. Immunol.* (1996). 35, 258
11. Bentin-Ley, U. & Lopata, A. In vitro models of human blastocyst implantation. *Bailliere's Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* (2000). 14, 765 - 774.Rodesch, F. et al. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet. Gynecol.* (1992). 80, 283 – 285.
12. Kingdom, J. et al. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* (2000). 92, 35 - 43.
13. Boyd, J. D. & Hamilton, W. J. *The human placenta*. W. Heffer & Sons, Cambridge. (1970).

14. Huppertz, B. et al.. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in human placenta. *Cell Tissue Res.* (1998). 291, 133 - 148.
15. Blond, J. L. et al. An envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J. Virol.* (2000). 74, 3321 - 9.
16. Mi, S. et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placenta morphogenesis. *Nature* (2000). 403, 715 - 717.
17. Frendo, J. L. et al. Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* (2003). 23, 3566-3574.
18. Pijnenborg, R. The origin and future of placental bed research. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* (1998). 81, 185 - 190.
19. Chakraborty, C. Et al. Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. *can. J. Physiol. Pharmacol.* (2002). 80, 116 - 124.
20. Risau, W. (1999). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671 - 674.
21. Kaufmann, P. & Kingdom, J. C. Development of the vascular system in the placenta. U Risau, W. & Rubanyi, G. (urednici). *Morphogenesis of Endothelium*. Harwood, Amsterdam (2000).
22. Demir, K. et al. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat. (Basel)* (1989). 136, 190 - 203.
23. Castellucci, M. et al. Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development. *Hum. Reprod. Update* (6) 5(2000). 485 – 494
24. Fox, H. Aging of the placenta. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* (1997). 77, 171 - 175.
25. Castellucci, M. & Kaufmann, P. A three-dimensional study of the normal human placental villous core. II. Stromal architecture. *Placenta* (1982). 3, 269 - 286.
26. Benirschke, K. & Kaufmann, P. (urednici) *Pathology of human placenta*. 3. izdanje, Springer, New York. (1995).
27. Demir, R. et al. Classification of human placental stem villi: Review of structural and functional aspects. *Microscopy Research and technique* (1997). 38, 29 - 41.
28. Castellucci, M. et al. The development of the human placental villous tree. *Anat. Embryol.* (1990). 181, 117 - 128.

29. Luckhardt, M. et al. Effects of physiologic perfusion - fixation on the morphometrically evaluated dimensions of the term placental cotyledon. *J. Soc. Gynecol. Invest.* (1996). 3, 166 - 167.
30. Becker, V. Allgemeine und spezielle Pathologie der Plazenta. U Becker, V., Schiebler, T. H. & Kubli, F (urednici), Die Plazenta des Menschen, Thieme, Stuttgart. (1981).
31. Salvatore, C. A. The placenta in acute toxemia. A comparative study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 102, 347 - 353.
32. Macara, L. et al. Elaboration of stem villous vessels in growth restricted pregnancies with abnormal umbilical artery Doppler waveforms. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* (1995). 102, 87 - 807 - 812.
33. Macara, L. et al. Structural analysis of placental terminal villi from growth-restricted pregnancies with abnormal umbilical artery Doppler waveforms. *Placenta* (1996). 17, 37 - 48.
34. Todros, T. et al. Umbilical Doppler waveforms and placenta villous angiogenesis in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Obstet. Gynecol.* (1999). 93, 499 - 503.
35. Kingdom, J. C. & Kaufmann, P. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta* (1997). 18, 613 - 626.
36. Hildebrandt VA, Babischkin JS, Koos RD, Pepe GJ, Albrecht ED. Developmental regulation of vascular endothelial growth/permeability factor messenger ribonucleic acid levels in and vascularization of the villous placenta during baboon pregnancy. *Endocrinology* 2001;142:2050-7
37. Huidobro-Toro JP, Gonzalez R, Varas JA, Rahmer A, Gonzalez R. Spontaneous rhythmic contractions of human placental vessels: is it an evidence for a physiological pacemaker in blood vessels? *Rev Med Chil* 2001;129:1105-12
38. Rajashekhar G, Loganath A, Roy AC, Wong YC. Expression and localization of angiogenin in placenta: enhanced levels at term over first trimester villi. *Mol Reprod Dev* 2002;62:159-66
39. Altshuler G. Chorangiomas: an important placental sign of neonatal morbidity and mortality. *Arch Pathol Lab Med* 1984; 108: 71-4.
40. Ferrara N, Davis-Smith T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18:4-25.

41. Wulff C, Wilson H, Dickson SE, Wiegand SJ, Fraser HM. Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoetins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod* 2002; 66:802-12.
42. Reynolds LP, Redmer DA. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod* 2001; 64(4):1033-1040.
43. Anthony RV, Limesand SW, Jeckel KM. Transcriptional regulation in the placenta during normal and compromised fetal growth. *Biochem Soc Trans* 2001; 29:42-48.
44. Mandriota SJ, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J Cel Sci* 1997;110:2293-2302.
45. Khaliq A, Foreman D, Ahmed A, Weich H, Gregor Z, McLeod D, Boulton M. Increased expression of placenta growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Lab Invest* 1998;78(1):109-16.
46. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999; 77:527-543.
47. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669-676.
48. Vuorela P, Hatva E, Lymboussaki A, Kaipainen A, Joukov V, Persico MG, Alitalo K, Halmesmaki E. Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biol Reprod* 1997; 56:489-494.
49. Vuorela P. Vascular endothelial growth factor, its receptors, and the Tie receptor in normal and complicated pregnancy. (Doktorska dizertacija). Helsinki: Medicinski fakultet, 2000.
50. Ancar B, Chardonens D. Geneva Foundation for medical education and research. Main regulators of angiogenesis and their role in preeclampsia and intrauterine growth restriction. Geneva : Aldo Campana, 2003.
51. Camera M, Giesen PL, Fallon J, Aufiero BM; Taubman M, Tremoli E; Nemerson Y. Cooperation between VEGF and TNF- $\alpha$  is necessary for exposure of active tissue factor on the surface of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:531-537.
52. Clauss M, Weich H, Breier G. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. *J Biol Chem* 1996;271:17629-17634.

53. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181:902-906.
54. Wang H, Keiser JA. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells. Role of Flt-1. *Circ Res* 1998; 83:832-840.
55. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:1358-1366.
56. Joško J, Gwozdz B, Jedrzejowska-Szypulka H, Hendryk S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit* 2000;6:1047-1052.
57. Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:561-569.
58. Tisher E, Mitchel R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor: Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266:11974-11984.
59. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 1999; 114:853-865.
60. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, Keshet E, Neufeld G. VEGF<sub>145</sub>, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 1997; 272:7151-7158.
61. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea HS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439-442.
62. Carmeliet P, Ferreira V, Breirer G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435-439.
63. Vuorela-Vepsalainen P, Alfthan H, Orpana A, Alitalo K, Stenman UH, Halmesmaki E. Vascular endothelial growth factor is bound in amniotic fluid and maternal serum. *Hum Reprod* 1998;14:1346-1351.
64. Ahmed A, Li XF, Dunk C, Whittle MJ, Rollason T. Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth Factors* 1995; 12:235-243.



65. Jackson MR, Carney EW, Lye SJ, Ritchie JW. Localisation of two angiogenic growth factors (PDEC GF and VEGF) in human placentae throughout gestation. *Placenta* 1994; 15:341-353.
66. Clark DE, Smith SK, Licence D, Evans AL, Charnock-Jones DS. Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *J Endocrinol* 1998;159:459-467.
67. Rajakumar A, Brandon HM, Dafary A, Ness R, Conrad KP. Evidence for the functional activity of hypoxia-inducible transcription factors overexpressed in preeclamptic placentae. *Placenta* 2004; 25:763-769.
68. McElhinney B, Ardill J, Caldwell C, Lloyd F, McClure N. Ovarian hyperstimulation syndrome and assisted reproductive technologies: why some and not others? *Hum Reprod* 2002;17:1548-1553.
69. Jelkmann W. Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clinical Chemistry* 2001; 47:617-623.
70. Alitalo K. Meniscus educational institute. Vascular endothelial growth factors-multiple roles in cancer. Helsinki, 2004.
71. Gordon JD, SHifren JL, Foulk RA, Taylor RN, Jaffe RB. Angiogenesis in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Surv* 1995; 50:688-697.
72. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. *J Biol Chem* 1997;272:23659-23667.
73. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood island formation and vasculogenesis in FLk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376:62-66.
74. Athanassiades A, Hamilton GS, Lala PK. Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol Reprod* 1998; 59:643-654.
75. Shibuya M, Ito N, Claesson-Welsh L. Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and-2. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237:59-83.
76. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269:26988-26995.

77. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 2001; 97:785-791.
78. Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:324-328.
79. Hornig C, Barleon B, Ahmad S, Vourela P, Ahmed A, Weich HA. Release and complex formation of soluble VEGFR-1 from endothelial cells and biological fluids. *Lab Invest* 1996; 80:443-54.
80. Daneshmand SS, Ramen HC, Moore TR, Bogic L. Preterm premature rupture of membranes: Vascular endothelial growth factor and its association with histologic chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:1131-1136.
81. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodorowicz D, Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187:1579-1586.
82. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NPH, Risau W, Ulrich A. High affinity binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993; 72:835-846.
83. Ahmed A, Perkins J. Angiogenesis and intrauterine growth restriction. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14:981-998.
84. Vuorela P, Carpen O, Tulppala M, Halmesmaki E. VEGF, its receptors and the Tie receptors in recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:276-282.
85. Ziche M, Maglione D, Ribatti D, Morbidelli L, Lago TC, Battisti M, Paoletti I, Barra A, Tucci M, Parise G, Vincenti V, Granger HJ, Viglietto G, Persico MG. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic and angiogenic. *Lab Invest* 1997;76:517-531.
86. Barleon B, Sozzani S, Zhou F, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor Flt-1. *Blood* 1996;87:3336-3343.
87. Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, Weich H, Fernandez B, Golomb G, Carmeliet P, Schaper W, Clauss M. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic. *Circ Res* 2003;92:378-385.

88. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor 3. *Science* 1998;282:946-949.
89. Clark DE, Smith SK, He Y. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod* 1998; 59:1540-48.
90. Banks R, Forbes M, Searles J. Evidence for the existence of a novel pregnancy associated soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:377-386.
91. Hornig C, Behn T, Bartsch W, Yayon A, Weich HA. Detection and quantification of complexed and free soluble human vascular endothelial growth factor receptor-1 (sVEGFR-1) by ELISA. *J Immunol Methods* 1999;226:169-177.
92. He Y, Smith SK, Day KA, Clark DE, Licence DR, Charnock-Jones DS. Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGFR-1) (Flt-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol Endocrinol* 1999;13:537-545.
93. McKeeman GC, Ardill JE, Caldwell CM, Hunter AJ; McClure N. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) is increased throughout gestation in patients who have preeclampsia develop. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191(4):1240-1246.
94. Soker S, Svajm CM, Neufeld G. Vascular endothelial growth factor is inactivated by binding to  $\alpha$ 2-macroglobulin and the binding is inhibited by heparin. *J Biol Chem* 1993; 268:7685-7691.
95. Migdal M, Huppertz B, Tessler S, Comforti A, Shibuya M, Reich R, Baumann H, Neufeld G. Neuropilin-1 is a placenta growth factor -2 receptor. *J Biol Chem* 1998; 273:22272-22278.
96. Helske S, Vourela P, Carpen O, Hornig C, Weich H, Halmesmäki E. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. *Mol Hum Reprod* 2001;7:205-210.
97. DiSalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwpk PW, Trivedi PG, Soderman DD, Palisi TM, Sullivan KA, Thomas KA. Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor-placenta growth factor heterodimer. *J Biol Chem* 1995;270:7717-7723.
98. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269:25646-25654.

99. Khaliq A, Li XF, Shams M, Sisi P, Acevedo CA, Weich H, Ahmed A. Localisation of placenta growth factor (PIGF) in human term placenta. *Growth Factors* 1996; 13:243-250.
100. Persico MG, Vincenti V, DiPalma T. Structure, expression and receptor binding properties of placenta growth factor (PIGF). *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237:31-40.
101. De Falco S, Gigante B, Persico MG. Structure and function of placental growth factor. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12:241-246.
102. Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang MK, Anand-Apte B, Weatherbee JA, Wang Y, Fang F, Flanagan JG, Tsang ML. Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996; 271:3154-3162.
103. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico G. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001; 7:575-583.
104. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ferraro MG, Aprelikova O, Alitalo K, Del Vecchio S, Lei KJ, Chou JY, Persico MG. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PIGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 1993; 8:925-931.
105. Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, McMaster MT, Fisher SJ, North RA. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:177-182.
106. Angelucci C, Lama G, Iacopino F, Maglione D, Sica G. Effect of placenta growth factor-1 on proliferation and release of nitric oxide, cyclic AMP and cyclic GMP in human epithelial cells expressing the Flt-1 receptor. *Growth Factors* 2001;19:193-206.
107. Cao Y, Ji WR, Qi P, Rosin A, Cao Y. Placenta growth factor: identification and characterisation of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235:493-498.
108. Maglione D, Battisti M, Tucci M. Recombinant production of PIGF-1 and its activity in animal models. *Farmaco* 2000; 55:165-167.

109. Hauser S, Weich HA. A heparin binding form of placenta growth factor (PlGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and placenta. *Growth Factors* 1993;9:259-268.
110. Green CJ, Lichtlen P, Huynh NT, Yanovsky M, Laderoute KR, Schaffner W, Murphy BJ. Placenta growth factor gene expression is induced by hypoxia in fibroblasts: a central role for metal transcription factor-1. *Cancer Res* 2001; 61:2696-2703.
111. Khaliq A, Dunk C, Jiang J, Shams M, Li XF, Weich H, Whittle M, Ahmed A. Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for “placental hyperoxia” in intrauterine growth restriction. *Lab Invest* 1999; 79:151-170.
112. Terman B, Khandke L, Dougher-Vermazan M, Maglione D, Lassam NJ, Gospodarowicz D, Persico MG, Bohlen P, Eisinger M. VEGF receptor subtypes KDR and Flt-1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor. *Growth Factors* 1994; 11:187-195.
113. Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, Shibuya M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ* 1996; 7:213-221.
114. Errico M, Riccioni T, Iyer S, Pisano C, Acharya KR, Persico MG, Falco S. Identification of placenta growth factor determinants for binding and activation of Flt-1 receptor. *J Biol Chem* 2004; 279:43929-43939.
115. Desai J, Holt-Shore V, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS. Signal transduction and biological function of placenta growth factor in primary human trophoblast. *Biol Reprod* 1999;60:887-892.
116. Crocker IP, Cooper S, Ong SC, Baker PN. Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblast and syncytiotrophoblast in normal pregnancy to those complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Pathol* 2003;162:637-643.
117. Regnault TR, Orbus RJ, de Vrijer B, Davidson ML, Galan HL, Wilkening RB, Anthony RV. Placental expression of VEGF, PlGF and their receptors in a model of placental insufficiency-intrauterine growth restriction (PI-IUGR). *Placenta* 2002; 23:132-144.
118. Athanassiades A, Lala PK. Role of placenta growth factor (PlGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness. *Placenta* 1998; 19:465-473.
119. Ahmed A. Heparin-binding angiogenic growth factors in pregnancy. *Trophoblast Res* 1997; 10:215-258.

120. Walsh TP, Grant GH. Computer modeling of the receptor-binding domains of VEGF and PlGF. *Protein Eng* 1997; 10:389-398.
121. Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1, and its heterodimerisation with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:324-328.
122. Rahimi N, Dayanir V, Lashkari K. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275:16986-16992.
123. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt-4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996; 15:290-298.
124. Dunk C, Ahmed A. Expression of VEGF-C and activation of its receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 in trophoblast. *Histol Hystopathol* 2001; 16:359-375.
125. Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 2002; 82:673-700.
126. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala M, Betsholz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004; 5:74-80.
127. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997; 276:1423-1425.
128. Wartiovaara U, Salven P, Mikkola H, Lassila R, Koukonen J, Joukov V, Orpana A, Ristimaki A, Heikinheimo M, Joensuu H, Alitalo K, Palotie A. Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thromb Haemost* 1998; 80:171-175.
129. Sohlstrom A, Katsman A, Kind KL, Roberts CT, Owens PC, Robinson JS, Owens JA. Food restriction alters pregnancy-associated changes in IGF and IGFBP in the guinea pig. *Am J Physiol* 1998; 274:E410-E416
130. Hamilton GS, Lysiak JJ, Han VK, Lala PK. Autocrine-paracrine regulation of human trophoblast invasiveness by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1. *Exp Cell Res*. 1998; 244:147-156
131. Roberts CT, Sohlstrom A, Kind KL, Grant PA, Earl RA, Robinson JS, Khong TY, Owens PC, Owens JA. Altered placental structure induced by maternal food restriction

- in guinea pigs: a role for circulating IGF-II and IGFBP-2 in the mother? *Placenta*. 2001; 22:S77-S82
132. Roberts CT, Kind KL, Earl RA, Grant PA, Robinson JS, Sohlstrom A, Owens PC, Owens JA. Circulating Insulin-like Growth Factor (IGF)-1 and IGF Binding Proteins-1 and -3 and Placental Development in the Guinea-pig. *Placenta*. 2002; 23:763-770
  133. Owens JA, Kind KL, Carbone F, Robinson JS, Owens PC. Circulating insulin-like growth factors-1 and-2 and substrates in fetal sheep following restriction of placental growth. *J Endocrinol*. 1994; 140:5-13
  134. Owens JA, Kind KL, Robinson JS. Oxygenation in uteros: placental determinants and fetal requirements. In *Placental Function and Fetal Nutrition* (Ed.) Battaglia PC, pp. 123-138. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott-Raven Publishers
  135. Lok F, Owens JA, Mundy L, Robinson JS, Owens PC. Insulin-like growth factor 1 promotes growth selectively in fetal sheep in late gestation. *Am J Physiol*. 1996; 270:R1148-R1155
  136. Philips ID, Simonetta G, Owens JA, Robinson JS, Clarke IJ, McMillen IC. Placental restriction alters the functional development of the pituitary-adrenal axis in the sheep fetus during late gestation. *Pediatr Res*. 1996; 40:861-866
  137. Carter AM. Current topic: restriction of placental and fetal growth in the guinea-pig. *Placenta*. 1993; 14:125-135
  138. Rockwell LC, Keyes LE, Moore LG. Chronic hypoxia diminishes pregnancy-associated DNA synthesis in guinea pig uteroplacental arteries. *Placenta*. 2000; 21:313-319
  139. Popvici RM, Lu M, Bhatia S, Faessen GH, Giaccia AJ, Guidice LC. Hypoxia regulates insulin-like growth factor-binding protein 1 in human fetal hepatocytes in primary culture; suggestive molecular mechanism for in utero fetal growth restriction caused by uteroplacental insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:2653-2659
  140. Han VK, Carter AM. Control of growth and development of the feto-placental unit. *Curr Opin Pharmacol*. 2001; 1:632-640
  141. Oliver MH, Harding JE, Breier BH, Gluckman PD. Fetal insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II are regulated differently by glucose or insulin in the sheep fetus. *Reprod Fertil Dev*. 1996; 8:167-172
  142. Gallaher BW, Oliver MH, Eichhorn K, Kiess W, Harding JE, Gluckman PD, Breier BH. Circulating insulin-like growth factor II/mannose-6-phosphate receptor and insulin-like growth factor binding proteins in fetal sheep plasma are regulated by glucose and insulin. *Eur J Endocrinol*. 1994; 131:398-404

143. Harding JE, Liu L, Evans PC, Gluckman PD. Insulin-like growth factor I alters fetoplacental protein and carbohydrate metabolism in fetal sheep. *Endocrinol.* 1994; 134:1509-1514
144. Liu L, Harding JE, Evans PC, Gluckman PD. Maternal insulin like growth factor I infusion alters fetoplacental carbohydrate and protein metabolism in pregnant sheep. *Endocrinol.* 1994; 135: 895-900
145. Jensen EC, van Zijl P, Evans PC, Harding JE. Effect of IGF-I on serine metabolism in fetal sheep. *J Endocrinol.* 2000; 165:261-269
146. Kimle RM, Breuer BH, Gluckman PD, Harding JE. Enteral IGF-I enhances fetal growth and gastrointestinal development in oesophageal ligated fetal sheep. *J Endocrinol.* 1999; 162:227-235
147. Vatten LJ, Odegard RA, Nilsen ST, Salvesen KA, Austgulen R. Relationship of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins in umbilical cord plasma to preeclampsia and infant birth weight. *Obstet Gynecol.* 2002; 99:85-90
148. Atkinson MA, MacLaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994; 331: 1428-36
149. Warram JH, Krolewski AS, Kahn CR. Determinants of IDDM and perinatal mortality in children of diabetic mothers. *Diabetes* 1988; 37: 1328-34
150. The outcome of diabetic pregnancies in relation to the mother's blood sugar level. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 112:213
151. Drazancic A. Diabetes and pregnancy. *Gynaekol Perinatol* 1994; 3, suppl 1:15-29
152. Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta. 2.izd. New York-Heidelberg: Springer, 1990
153. Lao TT, Lee CP, Wong WM. Placental weight to birthweight ratio is increased in mild gestational glucose intolerance. *Placenta* 1997; 18: 227-30
154. Clarson C, Tevaarwerk GJM, Harding PGR, Chance GW, Haust MD. Placental weight in diabetic pregnancies. *Placenta* 1989; 10: 275-81
155. Redline RW. Disorders of the placental parenchyma. U: Lewis SH, Perrin E, ur. Pathology of the placenta. 2. izd. New York-Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999, 161-84.
156. Ogino S, Redline RW. Villous capillary lesions of the placenta: distinction between chorangioma, chorangiomatosis and chorangiosis. *Hum Pathol* 2000; 31: 945-54
157. Younes B, Baez-Giangreco A, al-Nuaim L, al-Hakeem A, Abu Talib Z. Basement membrane thickening in the placentae from diabetic women. *Pathol Int* 1996; 46: 100-4.



158. Stanek J, Eis AL, Myatt L. Nitrotyrosine immunostaining correlates with increased extracellular matrix: evidence of postplacental hypoxia. *Placenta* 2001; 22 (suppl A): S 56-62
159. Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM Aspects of fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 25(2004), 103-113
160. Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* (2004) 25, 114-126.
161. King BF Ultrastructural differentiation of stromal and vascular components in early macaque placental villi. *Am J Anat* (1987). 178, 30-44.
162. Leach L, Babawale MO, Anderson M, Lammiman M Vasculogenesis, angiogenesis and the molecular organisation of endothelial junctions in the early human placenta. *J Vasc Res* (2002). 39, 246-259.
163. Demir R, Kayisli UA, Seval Y, Celik-Ozenci C, Korgun A, Demir-Weusten AY, Huppertz B Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* (2004) 25, in press.
164. Clark DE, Smith SK, Sharkey AM, Charnock-Jones DS Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Human Reprod* (1996) 11, 1090-1098.
165. Vuckovic M, Ponting J, Terman BI, Niketic V, Seif MW, Kumar S Expression of the vascular endothelial growth factor receptor, KDR, in human placenta. *J Anat* (1996). 188, 361-366.
166. Shore VH, Wang T-H, Wang C-L, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* (1997).18, 657-665
167. Dejana E Endothelial adherens junctions: Implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest* (1996) 98, 1949-1953.
168. Lampugnani MG, Zanetti A, Corada M, Takahashi T, Balconi G, Breviario F, Orsenigo F, Cattelino A, Kemler R, Daniel TO, Dejana E Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin,  $\beta$ -catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol* (2003). 161, 793-804

169. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* (1998). 111, 1853-1865.
170. Antonetti DA, Barber AJ, Khin SK, Lieth E, Tarbell JM, Gardner TW Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content. *Diabetes* (1998). 47:1953-1959.
171. Madri JA, Enciso J, Pinter E Maternal diabetes: effects on embryonic vascular development – a vascular endothelial growth factor-A-mediated process. *Pediatr Dev Pathol* (2003). 6, 334-341.
172. Le Noble F, Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, Djonov V, Matthijsen R, Breant C, Fleury V, Eichmann A Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development* (2004). 131, 361-375.
173. Mayhew TM Fetoplacental angiogenesis during gestation is biphasic, longitudinal and occurs by proliferation and remodelling of vascular endothelial cells. *Placenta* (2002). 23, 742-750.
174. Augustin HG Tubes, branches, and pillars. The many ways of forming a new vasculature. *Circ Res* (2000).89, 645-647.
175. Djonov V, Baum O, Burri PH Vascular remodelling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res* (2003). 314, 107-117.
176. Shiraishi S, Nakagawa K, Kinukawa N, Nakano H, Sueishi K Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the human placenta. *Placenta* (1996). 17, 111-121.
177. Cooper JC, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Palmer CR, Smith SK VEGF mRNA levels in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* (1996). 103, 1191-1196.
178. Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocrinol Metab* (2002). 87, 4213-4224.
179. Kumazaki K, Nakayama M, Suehara N, Wada Y Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. *Human Pathol* (2002). 33, 1069-1077.

180. Zhang EG, Burton GJ, Smith SK, Charnock-Jones DS Placental vessel adaptation during gestation and to high altitude: changes in diameter and perivascular cell coverage. *Placenta* (2002). 23, 751-762.
181. Hammes HP, Lin J, Renner O, Shani M, Lundqvist A, Betsholtz C, Brownlee M, Deutsch U Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* (2002) 51, 3107-3112.
182. Leach L, Gray C, Staton S, Babawale MO, Gruchy A, Foster C, Mayhew TM and James DK Vascular endothelial cadherin and beta-catenin in human fetoplacental vessels from pregnancies complicated by Type1 diabetes: associations with angiogenesis and perturbed barrier function. *Diabetologia*. Online first (2004) 10.1007/s00125-004-1341-7.
183. Glover V, Leach L Perfusion of human placental vessels with VEGF: Effect on leakage of 76 kDa dextran and junctional organisation. *J Vasc Res* (2003). 40, 306 (abstract).
184. Babawale MO, Lovat S, Mayhew TM, Lammiman MJ, James DK, Leach L Effects of gestational diabetes on junctional adhesion molecules in human term placental vasculature. *Diabetologia* (2000). 43, 1185-1196.
185. Jirkovská M, Kubínová L, Janáček J, Moravcová M, Krejčí V, Karen P Topological properties and spatial organization of villous capillaries in normal and diabetic placentas. *J Vasc Res* (2002).39, 268-278.
186. Teasdale F Histomorphometry of the human placenta in class C diabetes mellitus. *Placenta* (1985). 6, 69-82.
187. McParland P, Pearce JM Doppler blood flow in pregnancy. *Placenta* 9, 427-450.
188. Mayhew TM, Sørensen FB, Klebe JG, Jackson MR (1994) Growth and maturation of villi in placentae from well-controlled diabetic women. *Placenta* (1988). 15, 57-65.
189. Mayhew TM Enhanced fetoplacental angiogenesis in pre-gestational diabetes mellitus: the extra growth is exclusively longitudinal and not accompanied by microvascular remodelling. *Diabetologia* (2002).45, 1434-1439.
190. Teasdale F Histomorphometry of the human placenta in class B diabetes mellitus. *Placenta* (1983.) 4, 1-12.
191. Teasdale F Histomorphometry of the human placenta in class C diabetes mellitus. *Placenta* (1985). 6, 69-82.
192. Mayhew TM, Kaufmann P, Charnock-Jones DS Aspects of fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta* (2004). 25, 127-139.

193. Mayhew TM, Sørensen FB, Klebe JG, Jackson MR Oxygen diffusive conductances in placentae from control and diabetic women. *Diabetologia* (1993). 36, 955-960.
194. Mamopoulos M, Bili H, Tsantali C, Assimakopoulos E, Mantalenakis S, Farmakides G Erythropoietin umbilical serum levels during labor in women with preeclampsia, diabetes, and preterm labor. *Am J Perinatol* (1994). 11, 427-429.
195. Caro J, Erslev AJ, Silver R, Miller O, Birgegard G Erythropoietin production in response to anemia or hypoxia in the newborn rat. *Blood* (1982). 60, 984-988.
196. Costa-Giomi P, Caro J, Weinmann R Enhancement by hypoxia of human erythropoietin gene transcription in vitro. *J Biol Chem* (1990). 265, 10185-10188.
197. Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, Crivellato E, Presta M Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur J Clin Invest* (2003). 33, 891-896.
198. Benyo DF, Conrad KP Expression of the erythropoietin receptor by trophoblast cells in the human placenta. *Biol Reprod* (1999). 60, 861-870.
199. Davis LE, Widness JA, Brace RA Renal and placental secretion of erythropoietin during anemia or hypoxia in the ovine fetus. *Am J Obstet Gynecol* (2003). 189, 1764-1770.
200. Beltramo E, Pomero F, Allione A, D'Alù F, Ponte E, Porta M Pericyte adhesion is impaired on extracellular matrix produced by endothelial cells in high hexose concentrations. *Diabetologia* (2002). 45, 416-419.
201. Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, Bucala R, Adamis AP Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest* (1998). 101, 1219-1224.
202. Okamoto T, Tanaka S, Stan AC, Koike T, Kase M, Makita Z, Sawa H, Nagashima K Advanced glycation end products induce angiogenesis in vivo. *Microvasc Res* (2002). 63, 186-195.
203. Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* (2001). 153, 543-553.
204. Martin A, Komada MR, Sane DC Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Med Res Reviews*(2003). 23, 117-145.
205. Hovind P, Tarnow L, Oestergaard PB, Parving HH Elevated vascular endothelial growth factor in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* (2000). 75, S56-S61.

206. Speiser P, Gittelsohn AM, Patz A Studies on diabetic retinopathy. III. Influence of diabetes on intramural pericytes. *Arch Ophthalmol* (1968). 80, 332-337.
207. Darland DC, D'Amore PA Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J Clin Invest* (1999). 103, 157-158.
208. Crocker DJ, Murad TM, Greer JC Role of the pericyte in wound healing. An ultrastructural study. *Exp Mol Pathol* (1970). 13, 51-65.
209. Beck L, D'Amore PA Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J* (1997). 11, 365-373.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 8. veljače 1952. godine u Solinu, gdje sam završio osmogodišnje školovanje. Nakon završene gimnazije u Splitu, 1971. godine upisao sam se na Medicinski fakultet u Zagrebu i diplomirao 1976. godine. Nakon obavljenog pripravničkog staža radio sam jednu godinu u Zavodu za bolesti srca i krvnih žila, a 1980. godine započeo sam specijalizaciju iz ginekologije i opstetricije u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a u Zagrebu. Specijalistički ispit iz ginekologije i opstetricije položio sam 1984. godine.

Od 1982. godine zaposlen sam na Katedri za ginekologiju i opstetriciju kao asistent. Poslijediplomski studij iz perinatologije i neonatologije apsolvirao sam, a magistarski rad pod naslovom «Hemoglobin A1c u trudnica s dijabetesom ovisnim o inzulinu i gestacijskim dijabetesom» obranio sam 1996. godine.

Od studentskih dana, a posebice kao suradnik u nastavi na Katedri za ginekologiju i opstetriciju, aktivan sam u radu sa studentima na vježbama i seminarima u dodiplomskoj nastavi za predmet Ginekologija i opstetricija te veliki izborni predmet Zaštita majke i djeteta, predmetu Ginekologija i opstetricija na Visokoj zdravstvenoj školi te na poslijediplomskom studiju na kolegijima Dijabetologija te Dijabetes i trudnoća.

Objavio sam 20tak stručnih i kao koautor znanstvenih radova kao i članke za pojedine udžbenike.

Član sam Hrvatskog društva ginekologa i opstetričara te Hrvatskog društva za perinatalnu medicinu pri Hrvatskom liječničkom zboru.

Sada sam na mjestu pročelnika odjela babinjača.