

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Nikola M. Kolundžić

**GALEKTIN-1 I FUNKCIONALNA
SVOJSTVA ĆELIJA TROFOBLASTA
ĆOVEKA *in vitro***

doktorska disertacija

Beograd, 2012

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Никола М. Колунџић

**ГАЛЕКТИН-1 И ФУНКЦИОНАЛНА
СВОЈСТВА ЋЕЛИЈА ТРОФОБЛАСТА
ЧОВЕКА *in vitro***

докторска дисертација

Београд, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Nikola M. Kolundžić

**GALECTIN-1 AND FUNCTIONAL
PROPERTIES OF HUMAN TROPHOBLAST
CELLS *in vitro***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

KOMISIJA

dr Ljiljana Vićovac Panić, mentor

naučni savetnik Instituta za primenu nuklearne energije - INEP Univerziteta u Beogradu

dr Aleksandra Korać, mentor

redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Žanka Bojić-Trbojević, član

naučni saradnik Instituta za primenu nuklearne energije - INEP Univerziteta u Beogradu



ZAHVALNICA

Ekperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Odeljenju za biologiju reprodukcije Instituta za primenu nuklearne energije - INEP, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekata Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj, odnosno Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije „Ćelijske interakcije i molekularni mehanizmi u diferencijaciji ćelija u implantaciji embriona i placentaciji“ i „Trofoblast i ekstraembrionalne fetalne ćelije: plastičnost, faktori diferencijacije i in vitro modulacija funkcionalnih svojstava“ pod rukovodštvom dr Ljiljane Vićovac Panić, naučnog savetnika INEP-a.

Svom mentoru, dr Ljiljani Vićovac Panić, dugujem najveću zahvalnost, pre svega na izuzetnom strpljenju, kao i na ogromnom iskustvu i znanju koje mi je prenosila tokom mog naučnog usavršavanja. Posebno joj se zahvaljujem na stručnoj pomoći i neizmornoj podršci tokom izrade svakog dela ovog rada. Čast mi je, zadovoljstvo i privilegija što sam deo njenog naučno-istraživačkog tima.

Veliku zahvalnost dugujem dr Aleksandri Korać, redovnom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu na korisnim savetima i sugestijama, kao i na pomoći prilikom konačne izrade ove doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem dr Žanki Bojić-Trbojević, naučnom saradniku INEP-a, na vremenu i značajnom doprinosu koji je dala izradi ove disertacije svojim iskustvom u oblasti istraživanja. Njena stručna i moralna podrška bile su značajan podstrek, ali i velika pomoć u savlađivanju svih prepreka koje su se pojavljivale na ovom putu.

Svojim dragim kolegicama, Milici, Ivani, Tamari i Danici najsrdačnije zahvaljujem na velikoj pomoći tokom svih faza eksperimentalnog rada, kao i na moralnoj podršci koje su mi pružale svih ovih godina.

Takođe se zahvaljujem i svim ostalim kolegama iz instituta na stručnoj pomoći, korisnim savetima i prijateljskoj podršci.

Svojoj porodici dugujem zahvalnost na bezrezervnoj ljubavi i nepreštanju podršci tokom svih ovih godina, a posebno im se zahvaljujem na velikom razumevanju za sve moje životne izbore.

REZIME

U zoni interakcije majke i fetusa galektin-1 (gal-1) je eksprimiran na način koji ukazuje na njegovu moguću ulogu u ćelijskoj adheziji, migraciji i invaziji trofoblasta, procesima koji su ključni za implantaciju embriona i formiranje funkcionalne placente. Međutim, uloga gal-1 u trofoblastu čoveka dosada nije bila ispitivana, što je predmet istraživanja ovog doktorskog rada.

U tu svrhu korišćeni su odgovarajući funkcionalni *in vitro* testovi adhezije, migracije i invazije na modelima invazivnog trofoblasta (izolovanom citotrofoblastu iz placenti prvog trimestra normalne trudnoće, imortalizovanoj ekstravilusnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo, i, u manjoj meri, na horiokarcinomskoj ćelijskoj liniji JAr). Obzirom da gal-1 sintetišu i ekstravilusne trofoblastne i decidualne stromalne ćelije *in vivo*, u ovom radu je ispitivan mogući uticaj kako endogenog (upotrebom antitela prema gal-1 koja blokiraju i funkciju gal-1), tako i egzogenog gal-1 (upotrebom dveju molekularnih formi rekombinantnog humanog gal-1 dokazane biološke aktivnosti, od kojih jedna poseduje lektinsku aktivnost - CS-gal-1, a druga ne - Ox-gal-1) na funkcionalna svojstva trofoblasta *in vitro*. Značaj lektinskih interakcija za funkciju trofoblastnih ćelija ispitivan je funkcionalnim testovima u prisustvu laktoze (inhibitornog šećera za lektinski tip interakcija galektina). Zbog činjenice da se obrasci ekspresije, kao i funkcije galektina često znatno preklapaju, utvrđen je galektinskog profila invazivnog trofoblasta na nivou RNK i proteina.

U ovom radu je po prvi put pokazan funkcionalni značaj nekog od galektina za invazivnost trofoblasta čoveka *in vitro*, kvalifikujući gal-1 za važnog člana grupe molekula koji učestvuju u trofoblastnoj invaziji. Pokazali smo da endogeni gal-1, kao i dodatni egzogeni gal-1 (obe ispitivane molekularne forme) stimulišu invaziju trofoblasta, što ukazuje na mogućnost da bi i u uslovima *in vivo*, gal-1, kako trofoblastnog, tako i decidualnog porekla, mogao biti uključen u ovaj proces. Dobijeni rezultati su pokazali i da se ovaj uticaj gal-1 na invazivnu sposobnost trofoblasta ostvaruje pre svega njegovom lektinskom aktivnošću. Ovim radom je po prvi put utvrđen galektinski profil invazivnog trofoblasta koji čine gal-1, gal-3, i do sada u trofoblastu čoveka neidentifikovani član galektinske familije, gal-8.

Dobijeni rezultati predstavljaju napredak u razumevanju biološkog značaja gal-1 za trofoblastnu funkciju *in vitro*. Pored toga, oni su i dobra osnova za dalja ispitivanja mogućeg uticaja ovog lektina, kao i drugih članova galektinske familije koji su eksprimirani u invazivnom trofoblastu čoveka na procese koji su ključni za uspešnost trudnoće.

Ključne reči: gal-1, trofoblast, ćelijska invazija, izolovani citotrofoblast, HTR-8/SVneo, JAr, galektinski profil, gal-8.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija reprodukcije

UDK broj: 612.63:576.372]:[577.112.85+577.114] (043.3)

ABSTRACT

Galectin-1 (gal-1) is expressed at the fetomaternal interface in a manner suggestive of a potential involvement in cell adhesion, migration and invasion of the human trophoblast. These processes are considered essential for the embryo implantation and formation of the functional placenta. However, no studies have examined the role of the gal-1 in the human placenta. Hypothesis that gal-1 may be relevant for trophoblast invasion was addressed by this thesis for the first time.

To this end appropriate functional tests of cell adhesion, migration and invasion were performed *in vitro*, using invasive trophoblast models (isolated first trimester cytotrophoblast, immortalized extravillous HTR-8/SVneo cell line and choriocarcinoma JAr cell line). Since gal-1 is synthesised by both extravillous cytotrophoblast and decidual stromal cells *in vivo*, selected approaches addressed possible effect of both endogenous and exogenous gal-1. Use of function blocking anti-gal-1 antibody provided an insight into participation of endogenous gal-1, while supplementation by either molecular form of biologically active recombinant human gal-1, CS-gal-1 (with lectin activity) or Ox-gal-1 (without lectin activity) indicated relevance of exogenous gal-1 for trophoblast invasion *in vitro*. The importance of lectin-type interactions was investigated primarily using lactose (an inhibitory sugar for galectins). Since the expression patterns and functions of galectins often overlap, galectin profile of the invasive trophoblast at RNA and protein levels was established here.

This is the first study to address the functional relevance of any galectin for human trophoblast invasiveness *in vitro*, qualifying gal-1 as an important member of the trophoblast cell invasion machinery. It is documented here that endogenous gal-1, as well as additional exogenous gal-1 (both forms, but particularly the form with lectin activity) participate in trophoblast invasion, suggesting possible involvement of trophoblastic and decidual gal-1 in this process *in vivo*. Galectin profile of the invasive trophoblast was established here for the first time, which comprised of gal-1, gal-3 and gal-8.

The obtained findings improve current understanding of the biological relevance of the gal-1 for the trophoblast function *in vitro*. These results provide the basis for further

investigation of the mechanisms and effector molecules involved in gal-1 induced processes. Potential relevance of other expressed members of the galectin family for the invasive trophoblast remains to be elucidated.

Key words: gal-1, trophoblast, cell invasion, isolated cytotrophoblast, HTR-8/SVneo, JAr, galectin profile, gal-8.

Scientific field: Biology

Special topic: Biology of reproduction

UDC number: 612.63:576.372]:[577.112.85+577.114] (043.3)

SKRAĆENICE

ABC - avidin biotin peroksidazni kompleks

Asn - asparagin

BeWo - horiokarcinomska ćelijska linija BeWo

BSA - goveđi serumski albumin

cDNA - komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina

CK - citokeratin

CRD - domen odgovoran za vezivanje β -galaktozida

CS-gal-1 - mutantni galektin-1

CT - citotrofoblast

DAB - 3', 3' diamino benzidin tetrahidrohlorid

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM/F12 - Dulbecco-va modifikacija Eagle-ovog medijuma sa Ham-ovom smešom

EGF - epidermalni faktor rasta

EVT - ekstravilusni trofoblast

FCS - fetalni teleći serum

FN - fibronektin

gal - galektin

GalNAc - N-acetil-galaktozamin

GlcNAc - N-acetil-glukozamin

H₂O₂ - vodonik peroksid

hCG - humani horionski gonadotropin

HTR-8/SVneo - ekstravilusna trofoblastna ćelijska linija HTR-8/SVneo

IGF-II - insulinu sličan faktor rasta II

IGFBP-1 - IGF vezujući protein-1

IgG - imunoglobulin G

IL - interleukin

iRNK - informaciona ribonukleinska kiselina

JAr - horiokarcinomska ćelijska linija JAr

Jeg3 - horiokarcinomska ćelijska linija Jeg3
KD - konstanta disocijacije
Lac - laktoza
LacNAc - N-acetil-laktozamin
LN - laminin
MHC - glavni histokompatibilni kompleks
MMP - matriksna metaloproteinaza
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazol bromid
MUC1 - transmembranski mucin 1
NK ćelije - "prirodne ubice" ćelije
onfFN - onkofetalni fibronektin
Ox-gal-1 - oksidovani galektin-1
PBS - fosfatni pufer
RNK - ribonukleinska kiselina
RPMI 1640 - medijum za gajenje HTR-8/SVneo ćelija
RT-PCR - reverzna transkripcija-polimerazna lančana reakcija
SDS-PAGE - natrijum-dodecil-sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza
Ser - serin
ST - sinciotrofoblast
TF - Thomsen-Friedenreich antigen
TGF- α - transformišući faktor rasta alfa
TGF- β - transformišući faktor rasta beta
Thr - treonin
TIMP - tkivni inhibitor matriksnih metaloproteinaza
VN - vitronektin
VT - vilusni trofoblast

SADRŽAJ

UVOD	1
1.1. Evolucija placente čoveka	2
1.2. Placenta čoveka	3
1.2.1. Preimplantaciona faza	4
1.2.2. Implantacija embriona	6
1.2.3. Placentacija	8
1.2.4. Diferencijacija trofoblasta	13
1.2.4.1. Vilusni trofoblast	13
1.2.4.2. Ekstravilusni trofoblast	14
1.2.5. Molekulski mehanizmi trofoblastne invazije	18
1.3. Galektini	24
1.3.1. Biološki značaj glikozilacije proteina	24
1.3.2. Lektini	27
1.3.3. Strukturna svojstva galektina	28
1.3.4. Funkcionalna svojstva galektina	31
1.4. Galektin-1	33
1.4.1. Struktura i lokalizacija	33

1.4.2. Biološki značaj gal-1	34
1.4.3. Ekspresija i uloga gal-1 u placenti	36
CILJ ISTRAŽIVANJA	38
MATERIJAL I METODE	40
3.1. Tkivo	41
3.1.1. Smrznuti isečci	41
3.2. Antitela	42
3.3 Kulture trofoblastnih ćelija	43
3.3.1. Kultura izolovanog citotrofoblasta	43
3.3.2. Kultura ekstravilusne trofoblastne ćelijske linije HTR-8/SVneo	44
3.3.3. Kultura horiokarcinomske ćelijske linije JAr	45
3.4. Imunohistohemija	45
3.5. Imunocitohemija	46
3.6. SDS poliakrilamidna gel-elektroforeza i Western blot analiza	47
3.7. RT-PCR analiza	47
3.8. Detekcija i kvantitacija ćelija (MTT test)	48
3.9. Funkcionalni <i>in vitro</i> testovi	49
3.9.1. Test ćelijske adhezije	49
3.9.2. Test ćelijske migracije	49

3.9.3. Test ćelijske invazije	50
3.10. Statistička analiza i evaluacija imunohistohemijskog bojenja	51
REZULTATI	52
4.1. Galektinski profil invazivnog trofoblasta ćoveka	53
4.1.1. Imunolokalizacija gal-1 u tkivu normalne placente prvog trimestra	53
4.1.2. Imunolokalizacija gal-1 u izolovanom CT, imortalizovanoj ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo i horiokarcinomskoj ćelijskoj liniji JAr ..	55
4.1.3. Ekspresija galektina na nivou RNK i proteina u EVT <i>in vitro</i>	57
4.1.4. Imunolokalizacija gal-8 u tkivu normalne placente prvog trimestra	59
4.1.5. Imunolokalizacija gal-8 u izolovanom CT i ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo	61
4.2. Znaćaj lektinskog tipa interakcija za ćelijsku adheziju i migraciju trofoblasta <i>in vitro</i>	62
4.2.1. Uticaj šećera na adheziju trofoblasta	63
4.2.1.1. Uticaj šećera na adheziju HTR-8/SVneo ćelija	63
4.2.1.2. Uticaj šećera na adheziju JAr ćelija	64
4.2.2. Uticaj šećera na migraciju trofoblasta	64
4.2.2.1. Uticaj laktoze na migraciju HTR-8/SVneo ćelija	65
4.2.2.2. Uticaj šećera na migraciju JAr ćelija	66
4.3. Uticaj šećera na vijabilnost trofoblasta <i>in vitro</i>	66

4.3.1. Uticaj šećera na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija	67
4.3.2. Uticaj šećera na vijabilnost JAr ćelija	68
4.4. Uticaj endogenog gal-1 na ćelijsku adheziju i migraciju trofoblasta <i>in vitro</i>	68
4.4.1. Uticaj endogenog gal-1 na adheziju trofoblasta	69
4.4.1.1. Uticaj endogenog gal-1 na adheziju HTR-8/SVneo ćelija	69
4.4.1.2. Uticaj endogenog gal-1 na adheziju JAr ćelija	70
4.4.2. Uticaj endogenog gal-1 na migraciju HTR-8/SVneo ćelija	71
4.5. Uticaj gal-1 na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija <i>in vitro</i>	72
4.5.1. Uticaj endogenog gal-1 na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija	72
4.5.2. Uticaj egzogenog gal-1 na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija	73
4.6. Biološki značaj gal-1 za invazivna svojstva EVT <i>in vitro</i>	74
4.6.1. Uticaj endogenog gal-1 sa ekstracelularnom lokalizacijom na invaziju trofoblasta	75
4.6.1.1. Uticaj endogenog gal-1 na invaziju izolovanog CT	75
4.6.1.2. Uticaj endogenog gal-1 na invaziju HTR-8/SVneo ćelija	76
4.6.2. Značaj lektinskog tipa interakcija za invaziju trofoblasta	77
4.6.2.1. Uticaj laktoze na invaziju izolovanog CT	78
4.6.3. Uticaj egzogenog gal-1 na trofoblastnu invaziju	79
4.6.3.1. Uticaj egzogenog gal-1 na invaziju izolovanog CT	79

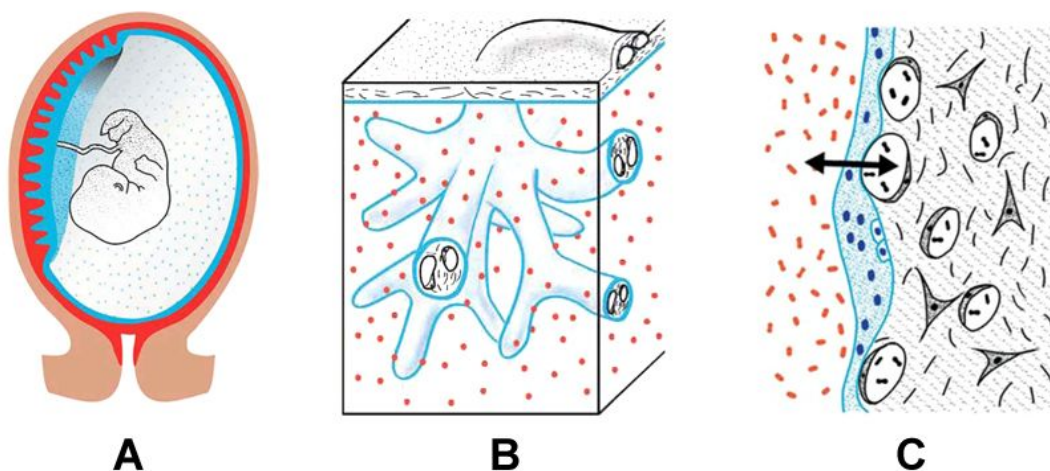
4.6.3.2. Uticaj egzogenog gal-1 na invaziju HTR-8/SVneo ćelija	80
4.6.4. Značaj lektinskog tipa interakcija za invaziju HTR-8/SVneo ćelija stimulisanu egzogenim gal-1	81
DISKUSIJA	83
ZAKLJUČCI	93
LITERATURA	95

UVOD

1.1. Evolucija placente čoveka

Placenta ili posteljica je visoko specijalizovan, privremeni organ, karakterističan za najveći broj vrsta sisara [1]. To je multipotentni organ koji uspešno sjedinjuje dva organizma (majku i fetus), ali ih u isto vreme i razdvaja. Unutar klase sisara, postoje značajne anatomske i funkcionalne razlike između placenti različitih vrsta. Tokom evolucije, došlo je do drastičnih promena, pre svega u veličini i obliku placente. Gotovo svi sisari formiraju **horio-alantoinsku** placentu koju obrazuju dve ekstraembrionalne strukture, **horion** i **alantois**. Horion predstavlja spoljašnji embrionalni/fetalni omotač, koji manje ili više diferencira u **horionske resice** (lat. *villi*). Iz alantoisa se razvijaju krvni sudovi, koji dopiru do svake horionske resice, i u vezi su sa krvotokom fetusa preko pupčane vrpce [2]. Nastankom horionskih resica, mnogostruko se povećava površina na kojoj se odvija razmena materija između fetusa i majke. Površinu horionskih resica pokriva **trofoblast**, koji je u neposrednom kontaktu sa tkivima majke. Trofoblast se diferencira na **sinciotrofoblast** i **citotrofoblast**.

Kod čoveka, funkcionalne horionske resice se obrazuju samo na delu horionske kese, u okviru jednog diska, stoga je placenta čoveka **diskoidalna** (*placenta discoidalis*) (**Slika 1A**). Ove horionske resice podležu intenzivnom rastu i grananju (**vilusni tip placente**) (**Slika 1B**). Funkcionalna svojstva placente čoveka zasnivaju se na građi tzv. **placentne barijere**. Placentna barijera tradicionalno predstavlja naziv za slojeve epitelnog i vezivnog tkiva, koji unutar zrele placente, razdvajaju cirkulatorne sisteme majke i fetusa. Sam naziv barijera je pomalo protivrečan, pošto placenta u krvotok fetusa, ipak propušta pored hranjivih, i neke štetne materije i viruse. Tokom trudnoće, preko ove selektivne barijere se obavlja celokupna fiziološka razmena između majke i fetusa [3]. Kod čoveka, horionske resice prodiru najdublje u zid uterusa i kupaju se u krvi majke, pa placentnu barijeru čine: trofoblast, mestimično stroma resice i endotel kapilara placente. Ovakva placenta je **hemo-horijalna** (**Slika 1C**). Kod visoko invazivne, hemo-horijalne placente, pri porođaju se odbacuje, ne samo fetalni deo placente, već i deo zida uterusa, koji učestvuje u njenoj izgradnji, stoga se ovakva placenta naziva i **decidualna** [2, 4].



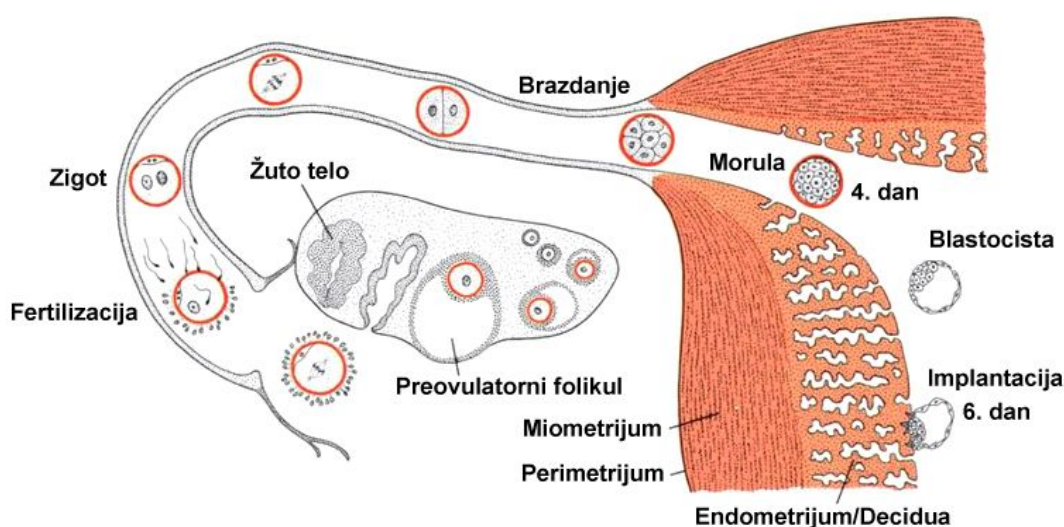
Slika 1. Placenta čoveka. Shematski prikaz diskoidalne (A), vilusne (B) i hemo-horijalne (C) placente čoveka. Modifikovano iz Pathology of the Human Placenta 5th ed., 2006 [2].

Na osnovu svega navedenog, može se reći da je zrela placenta čoveka diskoidalna, vilusna, hemo-horijalna i decidualna. Tokom trudnoće, ona funkcioniše kao surogat za brojne fetalne organe, i kao zaštita fetusu od imunskog odgovora majke. Dok se fetalni organi razvijaju, placenta preuzima ulogu pluća, bubrega, creva, jetre, endokrinih žlezda, imunskog sistema, kostne srži i kože fetusa [2]. Njeno razviće je veoma složen proces, čije se ključne faze odigravaju rano, u prvom trimestru trudnoće. Proces placentacije uključuje različite hormone, faktore rasta, citokine, hemokine, komponente vanćelijskog matriksa, matricelularne molekule, proteolitičke enzime i njihove inhibitore, adhezivne molekule, transmembranske receptore, signalne puteve, transkripcione faktore, kao i promene u parcijalnom pritisku kiseonika.

1.2. Placenta čoveka

Period razvića čoveka od stupnja oplodene jajne ćelije do rođenja nazivamo **prenatalnim razvićem**. Ono obuhvata dva različita perioda: **embrionalni** (od oplodjenja do

kraja osme nedelje trudnoće) i **fetalni** (od devete nedelje trudnoće do rođenja). Uporedo sa razvićem embriona, odnosno fetusa, dolazi i do razvića niza ekstraembrionalnih struktura - amniona, horiona, alantoisa, žumancetne kese, pupčane vrpce i placente [3]. Samo razviće placente, morfološki započinje u vreme implantacije, kada embrionski pol **blastociste** uspostavi kontakt sa epitelom uterusa [5-8]. Obrazovanje blastociste se odvija neposredno pre implantacije, pa rano razviće embriona i placente uslovno možemo podeliti na: **preimplantacionu** i **implantacionu fazu** (Slika 2).



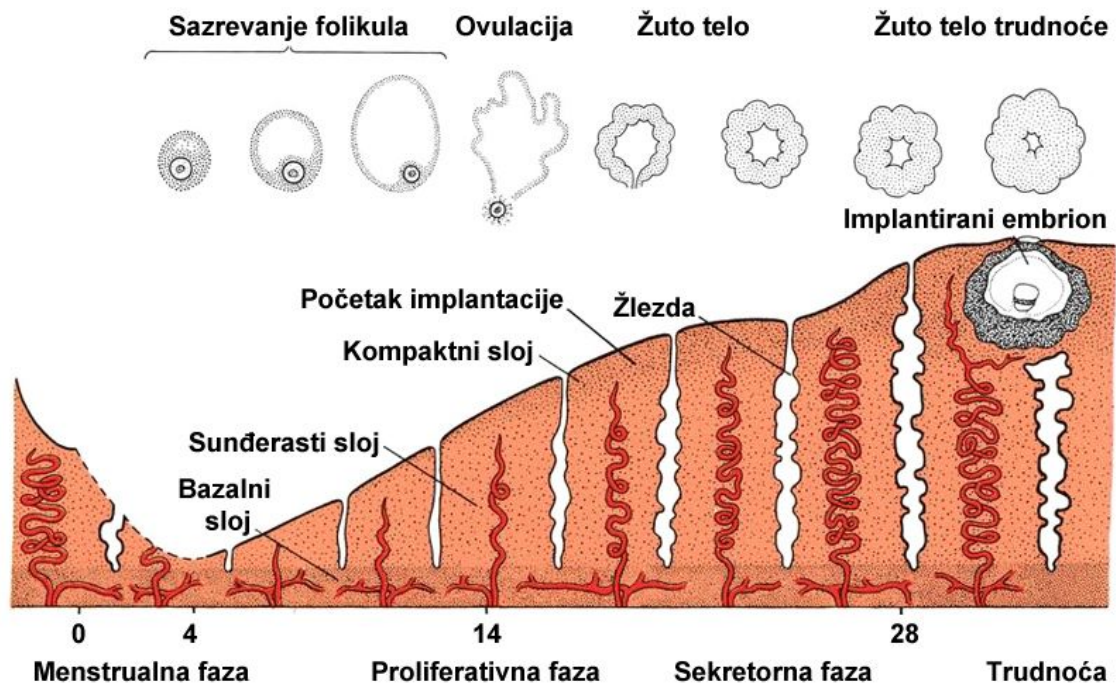
Slika 2. Prva nedelja razvića čoveka. Modifikovano iz Langman's Medical Embryology 11th ed., 2009 [8].

1.2.1. Preimplantaciona faza

Neposredno pre implantacije na/kod blastociste se razlikuje **unutrašnja masa ćelija** ili **embrioblast**, i sloj ćelija koji ga okružuje i zatvara šupljinu blastociste – **trofektoderm** [9]. Embrioblast predstavlja grupu pluripotentnih ćelija od kog će se razviti čitav embrion, kao i neke ekstraembrionalne strukture (amnion, žumancetna kesa, pupčana vrpca, mezenhim i krvni sudovi horionskih resica). Sa druge strane, trofektoderm prvi diferencira u ćelije trofoblasta, zadužene za implantaciju embriona i razviće placente [3, 8, 10]. Proces

implantacije uključuje složene interakcije između ćelija embriona i ćelija uterusa [11]. Pre same implantacije, dolazi do niza promena, kako u blastocisti, tako i unutar sluzokože materice. Priprema blastociste za implantaciju podrazumeva postepenu razgradnju *zone pellucide*, usled čega dolazi do brzog rasta blastociste, diferencijaciju ćelija trofektoderma, kao i sintezu različitih molekula koji posreduju u procesu implantacije [8].

Uterus takođe podleže nizu značajnih promena koje su pod kontrolom steroidnih hormona jajnika, estrogena i progesterona [12]. Pod njihovim dejstvom, tokom menstrualnog ciklusa endometrijum uterusa prolazi kroz tri faze: **folikularnu** ili **proliferativnu fazu**, **sekretornu** ili **progestacijsku** i **menstrualnu fazu**. Proliferativna faza započinje pod uticajem estrogena, koga luče ćelije rastućeg folikula jajnika na kraju menstrualne faze. U ovoj fazi dolazi do intenzivnog rasta endometrijuma (**Slika 3**). Sekretorna faza nastupa približno dva dana nakon ovulacije, u odgovoru na lučenje progesterona od strane **žutog tela** (*corpus luteum*) [8]. Nju karakteriše sekretorna aktivnost žlezda endometrijuma (**Slika 3**). Na samom početku ove faze, endometrijum je neprijemčiv za implantaciju blastociste [13]. U drugoj polovini sekretorne faze, tačnije oko 23. dana menstrualnog ciklusa, epitel endometrijuma podleže značajnim promenama i nakratko je u stanju da pričvrsti blastocistu. Taj kratak period u kome je endometrijum adekvatno pripremljen za implantaciju, naziva se **receptivna faza** [14, 15]. Istovremeno, u stromi uterusa nezavisno od implantacije započinje proces **decidualizacije** [16]. Neposredno pre implantacije, razlikuju se tri sloja na endometrijumu: površinski, **kompaktni sloj** (*stratum compactum*), središnji, **sunderasti sloj** (*stratum spongiosum*), i najdublji, tanki **bazalni sloj** (*stratum basale*) [8] (**Slika 3**). Od puberteta do menopauze, ciklične promene zahvataju samo prva dva sloja endometrijuma, pa se ovaj deo endometrijuma naziva i **funkcionalni sloj** [3]. Ukoliko ne dođe do oplodjenja jajne ćelije, žuto telo degeneriše, nivoi estrogena i progesterona naglo opadaju, usled čega dolazi do odlublivanja funkcionalnog sloja endometrijuma, i sve to je praćeno menstrualnim krvarenjem [3, 17]. Ako se fertilizacija ipak dogodi, onda endometrijum potpomaže implantaciju embriona i decidualizacija se još intenzivnije nastavlja, doprinoseći formiranju placente [8].



Slika 3. Promene unutar endometrijuma tokom menstrualnog ciklusa i rane trudnoće. Preuzeto iz Langman's Medical Embryology 11th ed., 2009 [8].

1.2.2. Implantacija embriona

Implantacija embriona čoveka je proces koji podrazumeva sinhronizaciju dve faze, tj. podudaranje faze u razviću blastociste kada je ona sposobna za implantaciju sa receptivnom fazom endometrijuma [14]. Vremensko preklapanje ove dve faze definiše okvir unutar kog je implantacija moguća ili „prozor implantacije“ [12, 18]. Implantacija kod čoveka uključuje i prevazilaženje imunskog odgovora majke [19], povećanu propustljivost kapilara endometrijuma na mestu implantacije [14], intenzivnu decidualizaciju strome endometrijuma nakon adhezije trofoblasta za epitel endometrijuma [20], diferencijaciju i kontrolisanu invaziju trofoblasta u deciduu uterusa [21]. Implantacija započinje obično oko šestog dana posle fertilizacije [22-24]. Početak implantacije predstavlja svojevrsan biološki paradoks, jer dolazi do adhezije apikalnih membrana dva sloja epitela, epitela

endometrijuma i trofektoderma (epitela blastociste) [25]. Nekoliko specifičnih adhezivnih molekula, naročito integrinski receptori, kao i različiti citokini, faktori rasta i prostaglandini, sa obe strane učestvuju u ovoj strogo regulisanoj fazi implantacije [3, 26, 27]. Međutim, tačan mehanizam i redosled ovih interakcija nije još uvek potpuno poznat [10, 26, 27]. Tokom procesa adhezije blastociste za zid uterusa, trofektoderm proliferiše i postepeno diferencira u dva sloja: spoljašnji višejedarni sincicijum - **sinciotrofoblast** i unutrašnji sloj jednojedarnih ćelija - **citotrofoblast**. Primitivni sinciotrofoblast prodire između epitelnih ćelija endometrijuma, proteolitički razgrađuje bazalnu membranu ispod njih, te tako stvara prostor blastocisti da uroni u stromu uterusa. Nakon toga, primitivni sincicijum počinje da vrši eroziju strome uterusa, i sve vreme nastavlja da raste usled proliferacije i sincicijalizacije ćelija citotrofoblasta.

Započeta decidualizacija endometrijuma se nastavlja kao složen odgovor uterusa na implantaciju embriona. Ona se odvija istovremeno na nekoliko nivoa (biohemijskom, morfološkom i fiziološkom). Citološki, decidualizacija se karakteriše diferencijacijom sitnih, vretenastih stromalnih ćelija u krupne, ovalne, epiteloidne **decidualne ćelije** [28, 29]. Ono što decidualne ćelije izdvaja unutar strome endometrijuma je izuzetna metabolička i sekretorna aktivnost. Citoplazma ovih ćelija sadrži mnoštvo masnih kapljica i granula glikogena. Pored toga, decidualne ćelije sintetišu i poseban vanćelijski matriks koji ih obavija [2, 30]. Stroma endometrijuma sadrži i različite imunske ćelije, prvenstveno makrofage, NK („natural killers“) ćelije, T limfocite i specijalizovane dendritične ćelije. Decidualne stromalne ćelije izlučuju brojne faktore (npr. IL-15, Fas ligand) koji kako se pretpostavlja ublažavaju proinflamatorne reakcije imunskih ćelija i doprinose imunotoleranciji semi-alogenog embriona [2]. Decidualizacijom su zahvaćene žlezde, kao i krvni sudovi endometrijuma [4]. Osnovna funkcija svih ovih promena je obezbeđivanje materija za ishranu zametka, zatim formiranje imunološki privilegovanog mesta za razviće placente i embriona, i regulacija invazije trofoblasta u tkiva uterusa [2, 3, 10]. Krajnji rezultat decidualizacije je transformacija funkcionalnog sloja endometrijuma u deciduu. Nakon implantacije, anatomski razlikujemo tri regiona decidue:

1. **bazalna decidua** (*decidua basalis*) je deo decidue ispod mesta implantacije, koji obrazuje majčinski deo placente;
2. **kapsularna decidua** (*decidua capsularis*) je deo decidue koji pokriva implantirani zametak i odvaja ga od šupljine uterusa;
3. **parijetalna decidua** (*decidua parietalis*) čini preostali deo decidue van mesta implantacije.

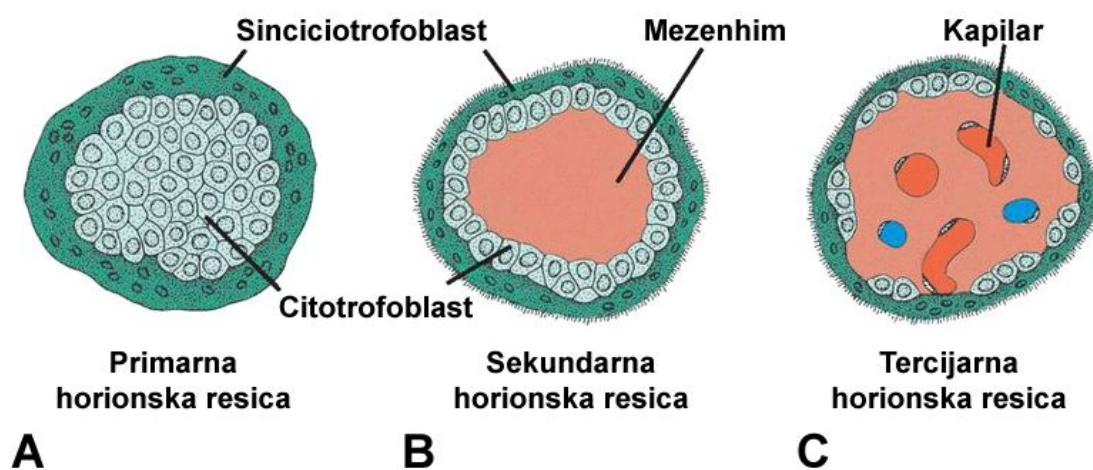
1.2.3. Placentacija

Obično osmog dana nakon oplodjenja, pojavljuju se sitne vakuole u amorfnom sloju rastućeg sincicijuma. Vakuole se, proširuju i sjedinjuju, formirajući **lakune**. Lakune su odvojene trakama sinciciotrofoblasta, poznatijim kao **trabekule**. Ovaj period u razviću placente, nazivamo **lakunarna faza (Slika 4A)**. Lakune se narednih dana šire svuda oko blastociste, dok trabekule sincicijuma između njih, longitudinalno rastu. Ubrzo, lakune bivaju ispunjene krvlju iz erodiranih kapilara endometrijuma majke. Ovaj proces traje do 12. dana razvića, kada se susedne lakune spajaju, i unutar sinciciotrofoblasta se obrazuje **lakunarna mreža**. Za to vreme, blastocista je već duboko usađena u stromu uterusa, a luminalni epitel endometrijuma je regenerisan [2, 3, 7, 22, 31]. Formiranjem lakuna, trofoblast koji okružuje blastocistu je podeljen na tri regiona: 1) **primarnu horionsku ploču**, koja je okrenuta ka šupljini blastociste; 2) **lakunarni sistem sa trabekulama**; 3) **trofoblastnu ljusku**, koja je u kontaktu sa stromom endometrijuma [2, 3, 7, 31].

Trinaestog dana razvića nastupa sledeća faza placentacije, koja traje do kraja četvrte nedelje trudnoće, i naziva se **rana vilusna faza (Slika 4B)**. Tokom ove faze dolazi do diferencijacije, rasta i grananja horionskih resica. U početku, primarna horionska ploča je sastavljena samo od neprekidnog sloja citotrofoblasta. Narednih nekoliko dana, **ekstraembrionalni mezenhim** diferencira preko proksimalne površine citotrofoblastnog sloja. Na taj način se postepeno obrazuje troslojna **horionska ploča**, sastavljena od mezenhima, citotrofoblasta i sinciciotrofoblasta. U ovom periodu, citotrofoblastne ćelije iz primarne horionske ploče, proliferišu i poniru u trabekule sincicijuma. Ovi izdanci

citotrofoblasta unutar trabekula sincicijuma predstavljaju **primarne horionske resice (Slika 4A, 5A)**, a lakune između njih, tada postaju **intervilusni prostor (Slika 4B)**. Na periferiji horionske kese, trabekule su spojene u spoljašnji sloj trofoblasta, trofoblastnu ljusku, koja je po nastanku pretežno sincicijum. Od 15. dana razvića, unutar trofoblastne ljuske se pojavljuju **citotrofoblastni ćelijski stubovi**. Oni nastaju proliferacijom ćelija citotrofoblasta smeštenih na vrhovima primarnih resica. Daljom proliferacijom citotrofoblastnih ćelija, ćelijski stubovi se bočno šire i međusobno spajaju, te se formira **citotrofoblastna ljuska**. Istovremeno, ekstraembrionalni mezenhim primarne horionske ploče urasta u srž primarnih resica, i tada one postaju **sekundarne horionske resice (Slika 5B)**.

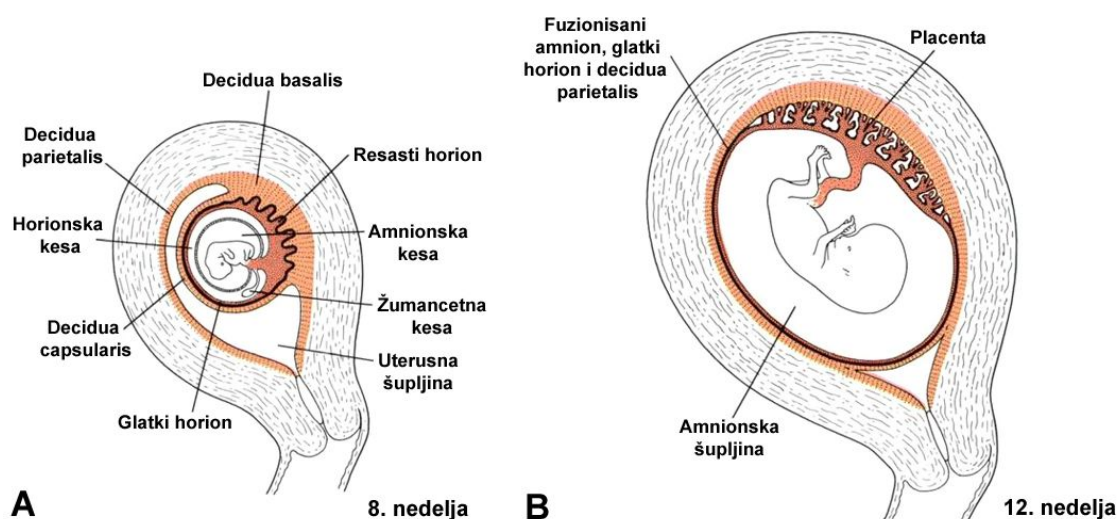
Sekundarne resice ubrzo počinju da se granaju, što predstavlja prvi stadijum obrazovanja **vilusnih stabala**. Kroz nekoliko dana, pojedine mezenhimske ćelije unutar sekundarnih resica će diferencirati u primitivne kapilare. Ovaj začetak placentalne vaskulogeneze označava pojavu **tercijarnih horionskih resica** [2, 7] (Slika 4B, 5C). Proces razvića novih horionskih resica, tokom čitave trudnoće prolazi kroz ova tri stupnja, pri čemu su prva dva prelazna [31].



Slika 5. Razviće horionskih resica. Shematski prikaz primarne (A), sekundarne (B), i tercijarne (C) horionske resice. Preuzeto iz Langman's Medical Embryology 11th ed., 2009 [8].

Početkom četvrte nedelje trudnoće, citotrofoblastna ljuska postaje deo **bazalne ploče**, usled čega se gubi jasna granica između horionske kese i endometrijuma. Bazalna ploča predstavlja izuzetno složenu i heterogenu strukturu placente, a čine je citotrofoblastne ćelije, decidualne ćelije, stroma decidue, ostaci žlezda endometrijuma, uteroplacentni krvni sudovi, i specifičan vanćelijski matriks, poznatiji kao **fibrinoid** [2, 7, 31]. Sa druge strane, brojna vilusna stabla koja polaze iz horionske ploče, nastavljaju sve intenzivnije da se granaju u intervalusnom prostoru. Na njima se mogu razlikovati **sidreće** i **plivajuće resice**. Sidreće resice nose ovaj naziv, jer povezuju horionsku sa bazalnom pločom placente. Ove resice predstavljaju neposredne derivate trabekula, stoga se često navode i kao **stem resice**. Resice koje rastu i granaju se kao izdanci stem resica, konačno postaju plivajuće resice.

Plivajuće resice u najvećoj meri učestvuju u fiziološkoj razmeni između majke i embriona, odnosno fetusa [7, 31]. Krajem četvrte nedelje trudnoće uspostavljena je primitivna fetoplacentna cirkulacija. U ovoj fazi razvića, placenta čoveka nije još uvek u pravom smislu hemo-horijalna i dominantan je histotrofni način ishrane embriona [4]. Horionske resice u početku prekrivaju čitavu horionsku kesu. Nakon osme nedelje razvića, horionske resice koje su u kontaktu sa kapsularnom deciduom, počinju da se degenerišu, pa se na tom delu formira **glatki horion** (*chorion laeve*). Na suprotnoj strani, horionske resice koje su u vezi sa bazalnom deciduom, ubrzano rastu i granaju se obrazujući **čupavi horion** (*chorion frondosum*) [2, 3, 22]. Na ovaj način, placenta čoveka zadobija konačan, diskoidalan oblik (Slika 6).

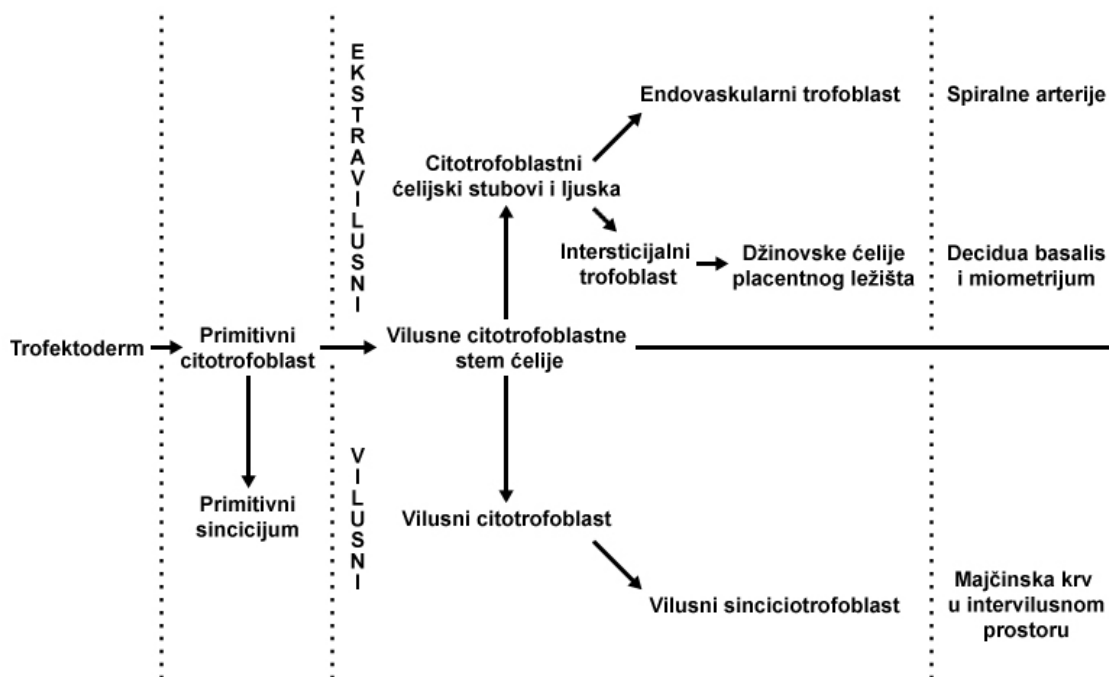


Slika 6. Fetalna faza razvića. Formiranje diskoidalne placente (A) i amniohorionske membrane (B). Preuzeto iz Langman's Medical Embryology 11th ed., 2009 [8].

Početkom drugog trimestra, placenta čoveka postaje u potpunosti hemo-horijalna [4]. Nju karakteriše funkcionalna uteroplacentna cirkulacija, koja sve do porođaja podržava rastuće potrebe fetusa.

1.2.4. Diferencijacija trofoblasta

Multipotentne citotrofoblastne ćelije, koje se većinom nalaze unutar sidrećih i plivajućih resica, diferenciraju tokom trudnoće duž dva posebna puta, pa tako razlikujemo **vilusni (VT)** i **ekstravilusni trofoblast (EVT)** [2, 30-35] (Slika 7).



Slika 7. Shematski prikaz diferencijacije trofoblasta. Modifikovano iz Human Implantation: Cell Biology and Immunology, 1995 [30].

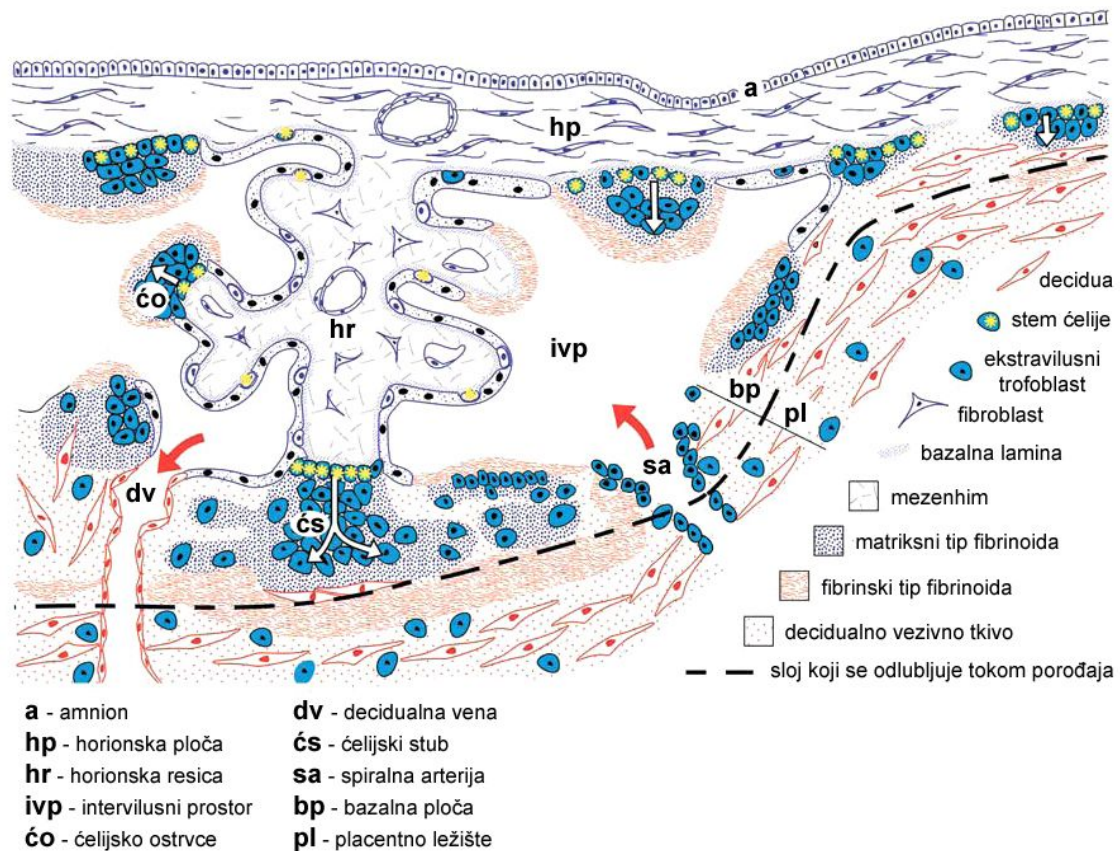
1.2.4.1. Vilusni trofoblast

Kao što je već pomenuto, prva diferencijacija trofoblasta dešava se još u početnoj fazi implantacije blastociste, kada iz trofektoderma nastaju primitivni sincicijum i primitivni citotrofoblast. Najveći deo ovog primitivnog trofoblasta postaće površinski omotač placentnih resica [31]. Ovaj omotač čine unutašnji sloj epitelnih ćelija - **vilusni citotrofoblast** i spoljašnji sloj sincicijuma - **vilusni sinciotrofoblast** (Slika 11). Vilusni

citotrofoblast leži na bazalnoj lamini, a čine ga jednojedarne, uglavnom nediferencirane citotrofoblastne ćelije, poznate i kao **Langhansove ćelije** [2]. Tokom trudnoće, ove ćelije neprestano proliferišu i ulaze u ciklus sincicijalizacije [36, 37]. Vilusni citotrofoblast je u početku obrazovanja horionskih resica i u prvoj polovini trudnoće neprekidan sloj. Nadalje, usled intenzivnog rasta i grananja, površina resica se mnogostruko povećava, pa sloj citotrofoblasta postaje diskontinualan. Sa druge strane, sinciotrofoblast u kontinuitetu prekriva površinu svih vilusnih stabala, kao i unutrašnje površine horionske i bazalne ploče tokom čitave trudnoće. Na taj način sloj sincicijuma oblaže ceo intervalusni prostor. Sinciotrofoblast predstavlja višejedarnu citoplazmatičnu masu sa varijabilnom količinom ćelijskih organela, koja se neprestano obnavlja fuzijom novih citotrofoblastnih ćelija [2, 31]. To je funkcionalni sloj placente.

1.2.4.2. Ekstravilusni trofoblast

Sav preostali trofoblast koji ne ulazi u sastav horionskih resica obuhvaćen je nazivom ekstravilusni trofoblast. Ekstravilusni trofoblast učestvuje u izgradnji svih nevilusnih delova placente, a to su glatki horion, horionska ploča, **ćelijska ostrvca** i bazalna ploča koja uključuje citotrofoblastnu ljusku, ćelijske stubove, i **placentne septe**. Ćelijska ostrvca predstavljaju posebne strukture unutar intervalusnog prostora, a čine ih agregati EVT ćelija, koji su izolovani od horionske ploče ili resica rastućom masom fibrinoida. Na bazalnoj lamini sidrećih resica nalaze se citotrofoblastne stem ćelije koje u najvećoj meri diferenciraju u invazivni EVT. Po svojoj lokaciji, ćelije EVT koje vrše invaziju u stromu decidue i deo miometrijuma predstavljaju **intersticijalni trofoblast**, dok one koje modifikuju spiralne arterije uterusa su poznate pod nazivom **endovaskularni trofoblast** [2, 31] (Slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz distribucije razlićitih populacija trofoblasta. Modifikovano iz Pathology of the Human Placenta 5th ed., 2006 [2].

Diferencijacija citotrofoblastnih stem ćelija u EVT podrazumeva postepenu transformaciju epitelnog fenotipa ovih ćelija u mezenhimski (intersticijalni trofoblast) ili endotelni fenotip (endovaskularni trofoblast) [38-41]. Ćelije EVT poseduju mnoge karakteristike tumorskih ćelija. Ovo se pre svega odnosi na ekspresiju i/ili supresiju specifićnih adhezivnih molekula, sekreciju proteolitićkih enzima koji vrše degradaciju vanćelijskog matriksa i aktivaciju razlićitih imunomodulatornih mehanizama [42]. Ono što ćini suštinsku razliku između EVT i tumorskih ćelija je ćinjenica da je invazija EVT u tkiva uterusa prostorno i vremenski ogranićena i strogo regulisana. EVT ćelije nikad nisu istovremeno u fazi proliferacije i invazije, kao što je to slućaj sa ćelijama malignih tumora. Proliferacija i invazija EVT su i prostorno odvojeni procesi, tako da se proliferacija odvija

isključivo u proksimalnom delu ćelijskog stuba. U medijalnom delu ćelijskog stuba nalaze se prvenstveno ćelije koje su prestale da se dele. One nastavljaju dalju diferencijaciju, tako što postepeno gube epitelni fenotip i zadobijaju svojstva migratornih i invazivnih ćelija [2, 41-47]. Tokom trudnoće, unutar bazalne decidue, kao i u okviru najdublje zone kontakta između EVT i tkiva uterusa, zvane **placentno ležište**, može se uslovno razlikovati nekoliko morfoloških formi intersticijalnog trofoblasta [2, 31]. U prvom, i prvoj polovini drugog trimestra unutar strome decidue i placentnog ležišta preovlađuju sitne, vretenaste, jednojedarne i **visoko invazivne ćelije intersticijalnog trofoblasta**. Do osme nedelje razvića ove ćelije dospevaju sve do prve trećine miometrijuma. Invazivni put diferencijacije intersticijalnog trofoblasta završava se formiranjem jednojedarnih **krupnih poliploidnih EVT ćelija** i višejedarnih **džinovskih ćelija placentnog ležišta** [2, 48-52]. Prema Kempu, poliploidne EVT ćelije su gotovo neinvazivne i nalaze se isključivo unutar bazalne ploče, gde proizvode vanćelijski matriks sastavljen uglavnom od laminina (LN), fibronektina (FN), kolagena tipa IV, vitronektina (VN) i heparan sulfata [50]. Njihov broj počinje naglo da raste tokom druge polovine trudnoće, pa neposredno pred porođaj one predstavljaju najbrojnije EVT ćelije. Sa druge strane, džinovske ćelije placentalnog ležišta se grupišu uglavnom na granici između endometrijuma i miometrijuma. Smatra se da one nastaju tokom prvog trimestra fuzijom više jednojedarnih EVT ćelija, a zatim, kako trudnoća odmiče, njihov broj počinje polako da opada [2, 31, 48-52]. Tokom intersticijalne invazije, EVT ćelije dolaze u kontakt, kako sa brojnim vrstama ćelija, tako i sa različitim molekulima vanćelijskog matriksa decidue. Pored toga, duž svog invazivnog puta diferencijacije, EVT ćelije i same sintetišu specifičan vanćelijski matriks (koji može biti i matriksni tip fibrinoida).

Za uspešan tok trudnoće, posebno je značajna komunikacija semi-alogenih EVT ćelija sa imunskim ćelijama decidue, koja doprinosi prevazilaženju imunskog odgovora majke. Tokom prvog trimestra trudnoće, razviće embriona i sama placentacija odigravaju se u hipoksičnim uslovima, za koje se smatra da onemogućuju nastanak slobodnih radikala, koji bi u ranoj fazi razvića mogli imati teratogeno dejstvo, usled nepostojanja efikasnih sistema zaštite od oksidativnog stresa unutar organa u razvoju [4, 11]. Nizak parcijalni pritisak kiseonika u prvom trimestru posledica je ograničenog dotoka oksigenisane krvi majke u

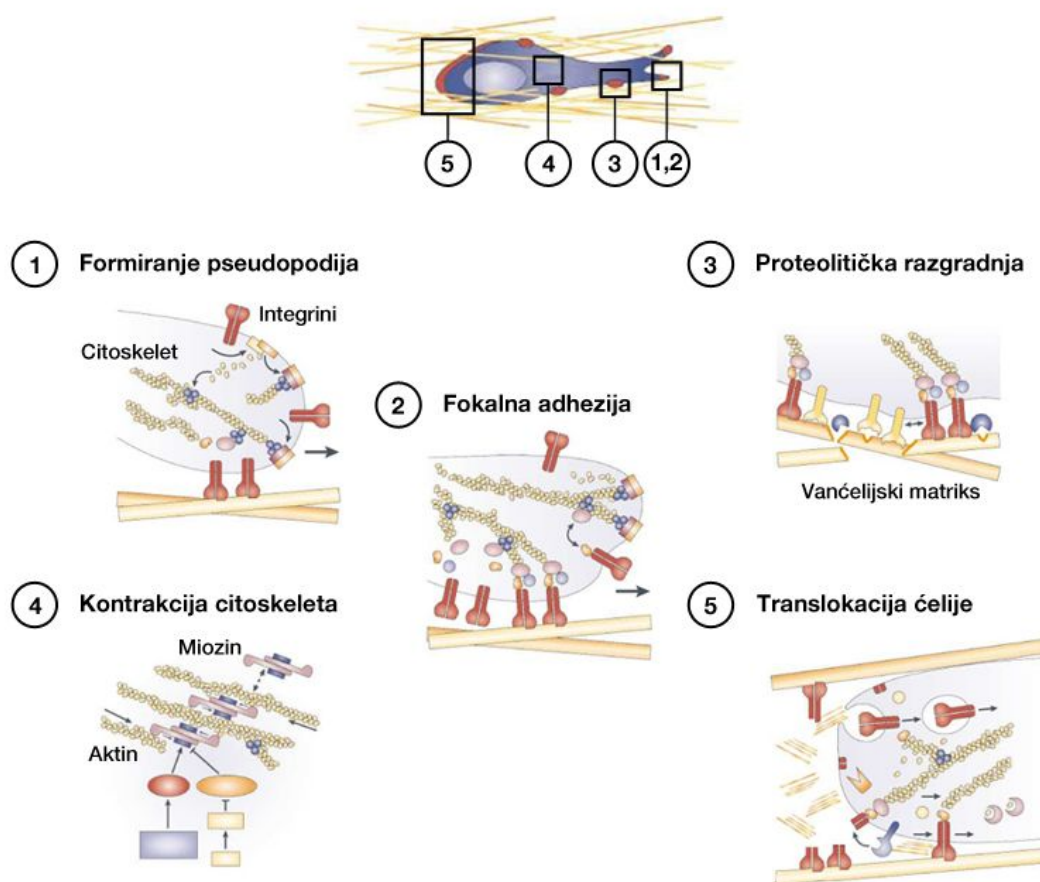
intervilusni prostor, obzirom da EVT ćelije citotrofoblastne ljuske sprečavaju rano uspostavljanje uteroplacentne cirkulacije, tako što obrazuju **endovaskularne trofoblastne čepove** na otvorima spiralnih arterija uterusa. Od osme nedelje trudnoće nivo kiseonika u intervilusnom prostoru postepeno raste. Početkom drugog trimestra, endovaskularni čepovi potpuno nestaju, nakon čega placenta postaje u pravom smislu hemo-horijalna [53, 54]. Tokom ovog prelaznog perioda, većinu nutrijenata za ishranu fetusa obezbeđuju žlezde endometrijuma, koje prazne svoj sadržaj u intervilusni prostor [55].

Trofoblastni čepovi predstavljaju i polaznu tačku diferencijacije endovaskularnog trofoblasta. Od proksimalnog dela endovaskularnog čepa, poput kapanja voska niz sveću, EVT ćelije započinju retrogradnu migraciju niz lumen spiralnih arterija [54, 56, 57]. Endovaskularna migracija EVT ćelija odigrava se u dva talasa [4]. Prvi talas se završava početkom 10. nedelje trudnoće na granici između endometrijuma i miometrijuma. Oko 15. nedelje trudnoće kreće drugi talas endovaskularne migracije, koji doseže sve do segmenata spiralnih arterija u miometrijumu [48, 56, 58]. U spiralnim arterijama, zavisno od lokalizacije trofoblasta, razlikujemo **intraarterijski** i **intramuralni trofoblast** [2, 4, 39, 59]. Intraarterijski trofoblast postepeno zamenjuje endotel spiralnih arterija i podleže epitelo-endotelnoj promeni fenotipa, ispoljavajući tipično vaskularni repertoar adhezivnih molekula (VE-kadherin, PECAM-1, VECAM-1 i $\alpha 4$ integrin) [39]. Ćelije trofoblasta koje se mogu uočiti u glatkomišićnom sloju zida spiralnih arterija poznate su kao intramuralne [2, 4, 59]. Intramuralni trofoblast zamenjuje glatke mišićne ćelije, najverovatnije, tako što izaziva njihovu apoptozu, nakon čega se u ovom sloju taloži masa fibrinoida [59, 60]. Uporedo sa ovim, dolazi i do proteolitičke razgradnje elastičnih vlakana u zidu arterija [61]. Nakon degeneracije mišićnog i elastičnog sloja, spiralne arterije predstavljaju krvne sudove koji se pasivno šire i koji su potpuno neosetljivi na različite vazokonstriktorne signale. Na taj način ovi sudovi su u stanju da kontinuirano sprovode velike zapremine krvi u intervilusni prostor sve do porođaja. Stoga, primarna funkcija endovaskularnog trofoblasta je učešće u fiziološkoj transformaciji spiralnih arterija majke, kako bi se obezbedila dovoljna količina krvi tokom hemotrofne faze ishrane fetusa. Remodeliranje spiralnih arterija započinje još tokom decidualizacije, koja delimično zahvata i ove sudove. Kasnije, ovaj proces potpomaže invazivna aktivnost intersticijalnog trofoblasta, i konačno, u

najvećoj meri endovaskularnog trofoblasta [58, 62]. Važno je istaći i činjenicu, da se endovaskularna invazija nikad ne odvija unutar decidualnih vena [4]. Na osnovu svega navedenog, može se reći da je adekvatna trofoblastna invazija uterusa majke ključan korak za normalnu placentaciju i uspešnu trudnoću.

1.2.5. Molekulski mehanizmi trofoblastne invazije

Za razliku od invazije tumorskih ćelija u maligno izmenjenim organima, invazija trofoblasta u decidualizovan zid uterusa predstavlja strogo regulisan, prostorno i vremenski ograničen proces [63]. Posmatrano u širem kontekstu, ćelije mogu vršiti invaziju tkivne strome pojedinačno, ili kao kohezivna grupa (kolektivna invazija) [64]. Strukturne i molekulske determinante kako samih invazivnih ćelija, tako i okolnog intersticijuma određuju modalitet ćelijske invazije. Sve te determinante su u međusobnoj zavisnosti i u nekoj vrsti dinamičke ravnoteže, a čine ih: tip, gustina, rigidnost i orijentacija vanćelijskog matriksa, kao i međućelijske interakcije između ćelija, adhezija ćelija za vanćelijski matriks, rigidnost i polarnost citoskeleta i pericelularna proteolitička aktivnost ćelija [65]. Vanćelijski matriks pruža strukturni okvir koji održava oblik ćelija, obezbeđuje integritet tkiva, te funkcioniše kao supstrat za ćelijsku adheziju, migraciju, invaziju i diferencijaciju. Invazija tkivne strome od strane pojedinačnih ćelija odvija se kroz nekoliko faza, koje se ciklično ponavljaju i uključuju: adheziju ćelije za komponente vanćelijskog matriksa (fibronektin, laminin, kolagen i dr.) preko specifičnih integrinskih receptora, formiranje pseudopodija, filopodija ili lamelipodija na frontalnoj strani migrirajuće ćelije usled promena u strukturi citoskeleta, proteolitičku razgradnju, odnosno remodeliranje vanćelijskog matriksa, i konačno retrakciju citoskeleta koja rezultuje translokacijom ćelije [65-67] (Slika 9).



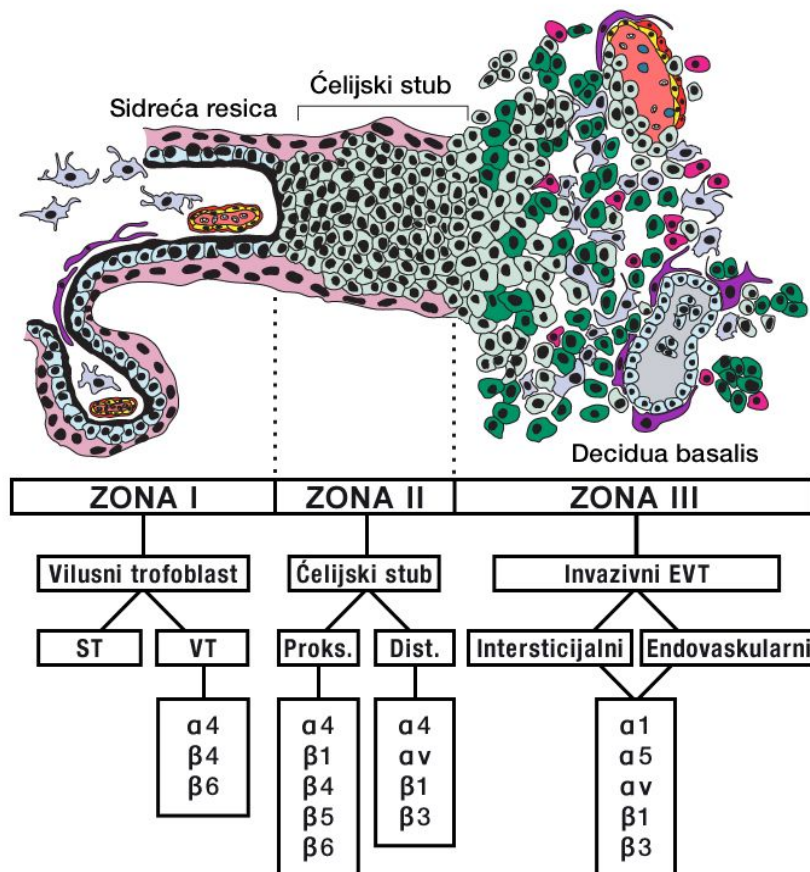
Slika 9. Shematski prikaz različitih faza ćelijske invazije. Modifikovano iz Friedl i Wolf, 2003 [67].

Sa druge strane, glavna karakteristika kolektivne migracije/invazije je fizička i funkcionalna povezanost grupe invazivnih ćelija. Pored toga, u okviru kohezivne grupe postignut je i izvestan stepen polarnosti zahvaljujući supracelularnoj organizaciji aktinskog citoskeleta. Konačno, kao i u slučaju invazije pojedinačnih ćelija, duž invazivnog puta grupe ćelija dolazi do remodeliranja okolnog vanćelijskog matriksa, ali i sinteze novog [64, 67]. Važno je istaći i činjenicu da su obrasci kolektivne migracije/invazije izuzetno plastični. Što se tiče invazije trofoblasta, može se reći da intersticijalna invazija predstavlja invaziju pojedinačnih EVT ćelija, dok je na primer intraluminalna migracija u znatnoj meri kolektivna. Proces transformacije epitelnog u mezenhimski fenotip počinje u medijalnom i

distalnom delu citotrofoblastnog stuba sidreće resice, a smatra se da su individualne intersticijalne EVT ćelije u invaziji okončale ovu tranziciju. Determinante invazije EVT predstavljaju različiti adhezivni molekuli (integrini, E-kadherin), komponente vanćelijskog matriksa, kao i brojni proteolitički enzimi koji vrše remodeliranje vanćelijskog matriksa [2, 4].

Integrini predstavljaju integralne transmembranske receptore, koji su sastavljeni od dve različite nekovalentno vezane subjedinice - α i β . Različite kombinacije α i β subjedinica određuju ne-ekskluzivnu specifičnost integrina za različite komponente vanćelijskog matriksa. Tako je integrin $\alpha 5 \beta 1$ receptor za fibronektin, $\alpha 6 \beta 4$ za laminin, $\alpha 1 \beta 1$ za laminin i kolagene tipa I i IV [2]. Integrinsko vezivanje za specifične molekule vanćelijskog matriksa ne pričvršćuje samo ćeliju za okolni supstrat, već joj obezbeđuje i molekulski okvir za ćelijsku migraciju i aktivaciju različitih signalnih puteva. Ovo vezivanje je višestepeni proces koji uključuje: aktivaciju integrinskih receptora, inicijalnu receptor-ligand interakciju, ojačavanje adhezije kroz reorganizaciju aktinskog citoskeleta, ostvarivanje fokalnog kontakta i promenu oblika ćelije [68-70]. Tokom invazije u zid uterusa ćelije EVT menjaju svoj integrinski profil u procesu koji je poznat kao **integrinsko prekopčavanje** [71, 72]. Citotrofoblastne, među kojima i trofoblastne stem ćelije, koje su ukotvljene u bazalnu laminu sidrećih resica ispoljavaju između ostalog, i $\alpha 6 \beta 4$ integrin na svom bazalnom polu. Nakon proliferacije ovih ćelija, dolazi do diferencijacije EVT unutar citotrofoblastnog stuba. Kako napreduju prema decidui, ćelije EVT uporedo smanjuju ekspresiju $\alpha 6 \beta 4$, a povećano ispoljavaju $\alpha 5 \beta 1$ integrin [38, 47, 72, 73]. Irving i Lala su pokazali da je za invazivna svojstva trofoblasta prvog trimestra *in vitro* ključna ekspresija $\alpha 5$ i $\beta 1$ subjedinice integrina [74]. Pored toga, ovi autori su pokazali i da nekoliko faktora koje luče decidualne stromalne ćelije *in vivo*, kao što su IGF-II (insulinu sličan faktor rasta II), IGFBP-1 (IGF vezujući protein-1) i TGF- β (transformišući faktor rasta beta) utiču na migraciju i invaziju trofoblasta *in vitro*, između ostalog i stimulacijom ekspresije integrina (TGF- β) ili u slučaju IGFBP-1, najverovatnije direktnom interakcijom sa integrinskim subjedinicama $\alpha 5$ i $\beta 1$ [74]. Vezivanje integrina za specifične konstituentne vanćelijskog matriksa može aktivirati brojne signalne puteve unutar ćelija trofoblasta [70, 75, 76]. Invazivni profil intersticijalnog trofoblasta uključuje ekspresiju $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 3$ i

$\alpha\beta 5$, dok je $\alpha\beta 4$ integrin potpuno odsutan [39, 50, 77, 78] (Slika 10). Endovaskularni trofoblast pretežno ispoljava integrine karakteristične za endotelne ćelije, kao što je $\alpha\beta 3$ [79] (Slika 10). Prema tome, adekvatna prostorno-vremenska ekspresija integrina, kao i interakcija ovih receptora sa odgovarajućim molekulima vanćelijskog matriksa su preduslov za normalnu diferencijaciju i invaziju EVT [2, 79].



Slika 10. Promena integrinskog profila ekstravilusnog trofoblata. Modifikovano iz Pereira i sar., 2005 [80].

Kao posledica transformacije epitelnog fenotipa EVT u invazivni ili vaskularni, pored integrina, menja se i ekspresija drugih adhezivnih molekula. Tako se kod invazivnih ćelija trofoblata ekspresija tipično epitelnih molekula smanjuje (E-kadherin, koneksin 40), a ekspresija tipično tumorskih (CEACAM1) i/ili endotelnih molekula povećava (VE-kadherin, PECAM-1, VECAM-1) [2, 38, 39, 81, 82]. Iako umnogome stiču citološka i

funkcionalna svojstva mezenhimskih ćelija, ćelije EVT nastavljaju da eksprimiraju epitelne intermedijarne filamente, poznate kao citokeratini. Stoga se antitela prema citokeratinu koriste kao pouzdan imunohistohemijski marker EVT ćelija, što umnogome olakšava diskriminaciju od decidualnih ćelija koje ih okružuju [2].

Kako EVT migrira u stromu decidue, promene u integrinskom profilu ovih ćelija prate i promene u sintezi molekula vanćelijskog matriksa [30]. Citotrofoblastne stem ćelije sintetišu i na polarizovan način deponuju specifičan vanćelijski matriks, bazalnu laminu, u čiji sastav ulaze kolagen tipa IV i VI, ćelijski fibronektin, laminin i heparan sulfat [2]. U proksimalnom delu ćelijskog stuba, prvi sloj, još uvek proliferativnih trofoblastnih ćelija, nastavlja da izlučuje na polarizovan način vanćelijski matriks, izgrađen predominantno od kolagena tipa IV i različitih izoformi LN [2, 72]. U medijalnom delu ćelijskog stuba, ćelije EVT započinju produkciju specifičnog heterogenog vanćelijskog matriksa (matriksni tip fibrinoida) koji je po sastavu sličan bazalnoj lamini, ali koga EVT ćelije deponuju na nepolarizovan način duž invazivnog puta diferencijacije [2, 72, 83-85]. U sastav matriksnog tipa fibrinoida ulazi nekoliko izoformi fibronektina, uključujući i onkofetalni fibronektin (onfFN), zatim izoforme laminina, kolagen tipa IV, vitronektin i heparan sulfat [2, 84-87]. Sinteza onfFN nije karakteristična za normalne adultne epitelne ćelije, i smatra se da u placenti ovaj glikoprotein vanćelijskog matriksa funkcioniše kao neka vrsta „lepka“, pričvršćujući sidreće resice za deciduu [2, 86].

Stroma decidue je takođe bogata vanćelijskim matriksom, koga uglavnom izlučuju decidualne stromalne ćelije i koji je po sastavu takođe sličan bazalnoj lamini, a sadrži uglavnom kolagen tipa IV, izoforme FN, LN i heparan sulfat [2, 30, 88]. Nezavisno od porekla, vanćelijski matriks podleže neprestanoj reorganizaciji, omogućavajući, ali i ograničavajući invaziju EVT posredstvom interakcija sa specifičnim integrinskim receptorima. Tako su Librach i saradnici pokazali da vezivanje $\alpha 5\beta 1$ integrina za fibronektin smanjuje invaziju trofoblasta, dok je blokiranje $\alpha 5\beta 1$ integrina specifičnim antitelima, kao i dodatak egzogenog fibronektina stimulišu u *in vitro* uslovima [89]. Sa druge strane, isti autori su utvrdili da $\alpha 1\beta 1$ integrin potpomaže trofoblastnu invaziju *in vitro*, dok blokiranje ovog integrina ili njegovih liganda (LN, kolagen tipa I i IV) specifičnim antitelima dovodi do smanjenja iste [89].

Invazija EVT u tkiva uterusa podrazumeva i aktivnost brojnih proteolitičkih enzima i njihovih inhibitora. Invazivni trofoblast razgrađuje različite komponente vanćelijskog matriksa pomoću različitih proteolitičkih enzima, a naročito klase supstratno-specifičnih enzima zvanih matriksne metaloproteinaze (MMP). Matriksne metaloproteinaze predstavljaju heterogenu grupu Zn-zavisnih endopeptidaza koje su uključene u mnoge fiziološke i patološke procese. Do sada su identifikovana 23 člana MMP familije gena (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -19, -20, -21, -23, -24, -25, -26, -27 i -28) u genomu čoveka [90, 91]. Većina MMP se izlučuje van ćelije u formi proenzima. Dodatan nivo regulacije MMP postiže se sekrecijom tkivnih inhibitora matriksnih metaloproteinaza (TIMP) [92, 93]. Pokazano je da trofoblastne ćelije eksprimiraju sve humane MMP na nivou RNK sa izuzetkom MMP-20 i -25 [34, 91-100], kao i njihove inhibitore TIMP-1, -2 -3 i -4 [91, 95, 101]. Rezultati brojnih istraživanja su identifikovali MMP-2 i MMP-9 kao značajne efektorne molekule koji su odgovorni za invazivne aktivnosti trofoblasta [34, 93, 98, 102-104].

Kontrola trofoblastne proliferacije, diferencijacije i invazije se ostvaruje autokrinim, jukstakrinim i parakrinim mehanizmima, i uključuje različite faktore rasta, citokine, hemokine, kao i promene u parcijalnom pritisku kiseonika [2, 107, 108]. Tako je pokazano da pored navedenih decidualnih faktora (IGF-II, IGFBP-1 i TGF- β), još neki faktori trofoblastnog i decidualnog porekla (epidermalni faktor rasta - EGF, transformišući faktor rasta alfa - TGF- α , itd.) mogu uticati na proliferaciju i/ili invaziju trofoblastnih ćelija [109-111]. U nekoliko *in vitro* studija, utvrđen je i autokrini i/ili parakrini uticaj IL-1, -6 i -8 na invazivnost trofoblasta [112-114]. Pored toga, Genbačev i saradnici su pokazali da hipoksija inhibira invaziju i stimuliše proliferaciju izolovanih trofoblastnih ćelija u *in vitro* uslovima [108, 115]. Međutim, iako postoji značajan uvid u molekulske mehanizme koji su uključeni u diferencijaciju i invaziju trofoblasta, i dalje postoji niz nepoznanica u vezi sa regulacijom ovih procesa. Poremećaji u kontroli diferencijacije, odnosno invazije EVT mogu dovesti do različitih patoloških procesa u trudnoći, kao što su preeklampsija, horiokarcinomi, invazivne mole i placenta accreta [2, 4, 77].

1.3. Galektini

Opšte je prihvaćena tvrdnja da interakcije endogenih lektina, između ostalih i galektina sa različitim glikokonjugatima, kao i specifični obrasci glikozilacije proteina mogu igrati značajnu ulogu u brojnim reproduktivnim procesima, uključujući implantaciju embriona i formiranje funkcionalne placentе [116-121].

1.3.1. Biološki značaj glikozilacije proteina

Tokom poslednjih nekoliko decenija istraživanja je ustanovljeno da interakcije između proteina i **glikana** igraju značajnu ulogu u mnogim ćelijskim procesima [122]. Glikani predstavljaju sveprisutne molekule u živom svetu. Kod eukariota, glikani se najčešće nalaze kovalentno vezani za mnogobrojne proteine i lipide, pa tako razlikujemo dve vrste glikokonjugata - **glikoproteine** i **glikolipide**. **Glikozilacija** je najčešći oblik posttranslacione modifikacije proteina kod sisara. Udeo glikana u molekulu glikoproteina može biti sasvim zanemarljiv, međutim, to je pre izuzetak, nego pravilo. Tako je pokazano da znatan procenat molekulske mase mnogih glikoproteina čine upravo šećeri. Sveukupni repertoar glikana u ćeliji ili organizmu čini **glikom**. Zahvaljujući hemijskim karakteristikama svojih monomera, monosaharida, kao i činjenici što nisu primarni genski produkti, poput proteina, ugljeni hidrati predstavljaju najvarijabilnije biomolekule. Za razliku od proteina i nukleinskih kiselina, čiji monomeri grade isključivo linearne polimere, polimerizacija glikana uključuje i grananje. Iako svega desetak monosaharida ulazi u sastav animalnih glikana, otkrivena je izuzetna varijabilnost u strukturi šećernog dela glikoproteina koju obezbeđuje relativno mali broj gena, koji kodira enzime uključene u izgradnju različitih ugljenohidratnih nizova (**glikoziltransferaze** i **glikozidaze**) [123]. Izvori diverziteta ugljenohidratnih nizova čine: specifičan redosled monosaharida, položaj glikozidne veze, anomerna konfiguracija glikozidne veze (α ili β), broj i položaj mesta grananja. Dodatna raznolikost glikana, nastaje usled kovalentnih modifikacija

monosaharida (fosforilacija, metilacija, O-acetilacija itd.), koje su često preduslov za specifičnu biološku aktivnost glikokonjugata [123-125]. Uzevši sve to u obzir, jasno je da količina bioloških informacija koju sadrži glikom mnogostruko premašuje onu koja je zapisana unutar genoma i proteoma [123].

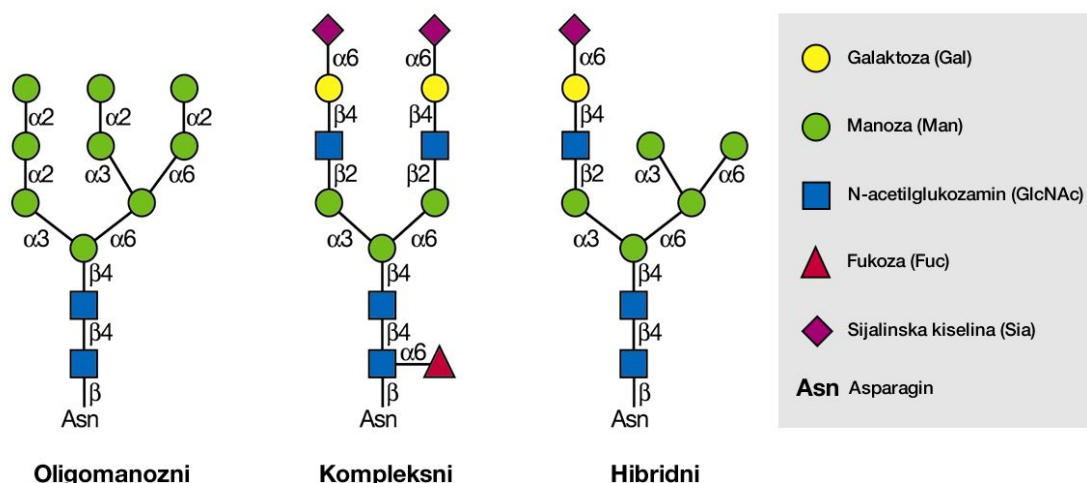
Biološki značaj kovalentno vezanih glikana ogleda se, kako kroz njihova fizičko-hemijska svojstva, tako i kroz njihov ogroman potencijal za skladištenje bioloških informacija. Glikani mogu da utiču na strukturu i/ili funkciju glikoproteina na nekoliko načina, i to na:

- 1) pravilnu konformaciju glikoproteina;
- 2) fizičko-hemijske osobine glikoproteina;
- 3) aktivaciju i/ili modulaciju specifičnih glikoproteina (antitela, enzimi, hormoni, receptori itd.).

Najveći broj funkcija glikana proističe iz činjenice što su oni nosioci različitih bioloških informacija [123, 126-128]. Stoga, specifično prepoznavanje određenih struktura glikana i adekvatno prevođenje šećernog koda predstavljaju dve ključne aktivnosti u održavanju ćelijske homeostaze. Molekuli koji imaju ovu sposobnost su **lektini**.

Ugljenohidratna komponenta glikoproteina je sastavljena uglavnom od više oligosaharidnih jedinica. Oligosaharidi sadrže od 2 do 20 monosaharida vezanih glikozidnom vezom. U zavisnosti od načina na koji se šećerne komponente kovalentno vezuju za proteinski deo glikoproteina razlikujemo: **N-glikozidnu** i **O-glikozidnu vezu**. N-glikozidna veza se obično ostvaruje preko N-acetil-glukozaminskog ostatka (GlcNAc) glikana. Ovaj monosaharid se vezuje za amidnu grupu asparaginskog ostatka (Asn) na polipeptidnom lancu. Sa druge strane, O-glikozidna veza se ostvaruje između šećera i hidroksilne grupe serina (Ser) ili treonina (Thr). Monosaharid koji najčešće učestvuje u izgradnji ove veze je N-acetil-galaktozamin (GalNAc) [123, 129]. Na osnovu tipa glikozidne veze sa proteinom, oligosaharidi koji ulaze u sastav glikoproteina, dele se na: **N-glikane** i **O-glikane**. Na obe vrste glikana mogu se razlikovati: visoko konzervirano jezgro,

koje je vezano za protein i varijabilni, granati ostatak oligosaharida tzv. antene. Najveći broj glikoproteina sadrži isključivo N-glikane. Sve N-glikane karakteriše pentasaharidno jezgro koje se vezuje za Asn ostatak polipeptidnog lanca (Man α 1-3(Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn). Na osnovu građe varijabilnog terminusa, N-glikani se dele na: oligomanozne, kompleksne i hibridne [123] (Slika 11).



Slika 11. Tipovi N-glikana. Modifikovano iz Essential of Glycobiology 2nd ed., 2009 [123].

O-glikani pretežno ulaze u sastav glikoproteina mucinskog tipa. Smatra se da visok sadržaj šećera u ovim molekulima utiče na njihove fizičko-hemijske osobine, pa tako čini agregate ovih molekula značajnom fizičkom barijerom i sekret bogat mucinima hidratiše i štiti epitelne površine respiratornog, gastrointestinalnog i urogenitalnog trakta sisara [123]. Pojedini glikoproteini sadrže u svojoj strukturi obe vrste glikana [129].

Poseban aspekt glikozilacije proteina predstavlja fenomen **mikroheterogenost glikoproteina**. Ovaj fenomen označava prisustvo više različitih **glikoformi** jednog glikoproteina. Vrste glikoformi mogu znatno da variraju, pre svega u zavisnosti od fiziološkog stanja ćelije. Biološki značaj mikroheterogenosti je još uvek nedovoljno jasan, ali se pojedine glikoforme često dovode u vezu sa različitim patološkim stanjima [123].

Kada je reč o glikozilaciji u zoni interakcije majke i fetusa važno je istaknuti nekoliko činjenica. Na površini sinciotrofoblasta, koja je u direktnom kontaktu sa krvlju majke,

detektovani su slični obrasci N-glikozilacije kod različitih vrsta sisara sa hemohorijalnom placentom. Tako je pokazano da kod ovih vrsta na apikalnoj membrani sincicijuma preovlađuju bi-, tri- i tetraantenarni kompleksni N-glikani, sa visokim sadržajem N-acetil-laktozamina (-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-) i terminalne sijalinske kiseline vezane α 2,3 glikozidnom vezom [120]. Kompleksni N-glikani sa visokim sadržajem N-acetil-laktozamina ulaze i u sastav glikoproteina vanćelijskog matriksa koje sintetizuje ekstravilusni trofoblast, naročito su zastupljeni u onfFN i u nekim izoformama LN [130, 131]. Sa druge strane, pokazana je značajna heterogenost u glikozilaciji proteina glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC) koji doprinose imunotoleranciji semi-alogenog fetusa [132, 133].

1.3.2. Lektini

Lektini su proteini ili glikoproteini koji prepoznaju i vezuju specifične ugljenohidratne epitope, bez njihove modifikacije [134]. Ovi molekuli dele neke sličnosti sa antitelima. Poput antitela, i lektini imaju sposobnost aglutinacije ćelija i precipitacije glikokonjugata. Štaviše, kao što jedinjenja male molekulske mase (hapteni) specifično inhibiraju antitela, tako i lektinska aktivnost može biti inhibirana, za svaki lektin specifičnim šećerom (monosaharidom ili disaharidom). Lektine obično karakterišu vezujuća mesta sa niskim afinitetom prema monosaharidima (vrednosti konstante disocijacije - K_D se često kreću u milimolarnom opsegu) [122, 123, 135]. Sa druge strane, lektini se vezuju sa visokim afinitetom za odgovarajuće oligosaharide, što je preduslov za njihovu funkciju. Selektivnost ili visoka specifičnost lektina postiže se kombinacijom vodoničnih veza, van der Valsovih sila i hidrofobnih interakcija između šećernih struktura i bočnih lanaca određenih aminokiselina unutar vezujućeg mesta [123]. Prema tome, za optimalnu lektinsku aktivnost neophodno je istovremeno uspostavljanje više protein-glikan interakcija. Postoji nekoliko načina na koje se ovo postiže: a) multivalentnost ugljenohidratnog liganda; b) glikan-vezujuće mesto koje obuhvata više od jednog monosaharidnog ostatka; c) više nezavisnih glikan-vezujućih mesta unutar istog

polipeptidnog lanca lektina; d) oligomerizacija lektina; e) kombinacije navedenih modaliteta [135-140]. Pored glikan-vezujućih mesta lektini mogu da sadrže jedan ili više domena koji stupaju u interakcije sa ligandima koji nisu šećeri [134]. Animalni lektini imaju varijabilnu tkivnu distribuciju i mogu biti lokalizovani unutar ćelije, na površini ćelije, kao i u vanćelijskom prostoru. Lokalizacija ovih proteina odražava i njihovu potencijalnu funkciju [141]. Tako su lektini unutar ćelije uglavnom uključeni u put sekrecije proteina, dok membranski lektini posreduju u interakcijama između ćelija (lektin-endogeni glikan interakcije), kao i u interakcijama između ćelija i patogenih mikroorganizama (lektin-egzogeni glikan interakcije). Kada se lektini sekretuju van ćelije, oni obično posreduju u adheziji ćelije za glikoproteine vanćelijskog matriksa [122, 141]. Na osnovu evolutivnog porekla i/ili strukturne sličnosti, animalni lektini su grupisani u nekoliko familija (lektini tipa C, galektini, lektini tipa I, lektini tipa P, itd.) [122, 123]. Jedna od najviše izučavanih familija animalnih lektina su **galektini**. U placenti čoveka je identifikovano nekoliko članova ove familije lektina. Pored galektina, u placenti se nalaze i brojni drugi lektini (kolektini [142, 143], selektini [144], sigleci [145], manozni receptor [146], kalretikulin [147], itd.) čija se ugljenohidratna specifičnost razlikuje od galektinske.

1.3.3. Strukturna svojstva galektina

Galektini (**gal**) pripadaju evolutivno viskoko konzerviranoj familiji solubilnih lektina, koju karakteriše specifičan redosled aminokiselina (engl. **carbohydrate-recognition domain** ili **CRD**), odgovoran za vezivanje β -galaktozida [148]. Prvobitan naziv za galektine, bio je lektini tipa S [122, 149]. Do danas je identifikovano 19 pripadnika ove familije lektina kod sisara, od čega je 13 eksprimirano kod čoveka (gal-1, -2, -3, -4, -7, -8, -9, -10, -12, -13, -14, -16, i -17) [150].

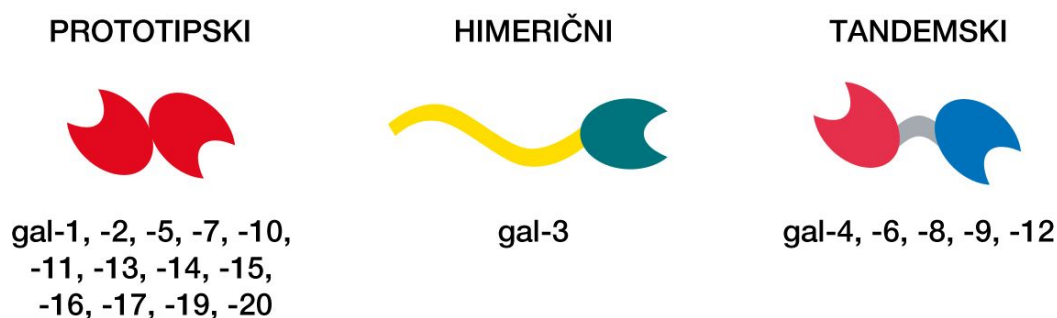
Galektini sisara podeljeni su prema svojoj strukturi u tri grupe:

1) **prototipski galektini** (gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15, -16, -17, -19, -20);

2) **himerični galektini** (gal-3);

3) **tandemski galektini** (gal-4, -6, -8, -9, -12).

Prototipski galektini sadrže samo jedan CRD domen i uglavnom obrazuju homodimere (gal-5, -7 i -10 su monomeri). Usled razlika u primarnoj strukturi, prototipski galektini mogu da formiraju homodimere na nekoliko načina [122, 149]. Dimerizacija ovih galektina odvija se isključivo nekovalentnim interakcijama, osim u slučaju gal-13, čije se dve subjedinice povezuju disulfidnim vezama [149]. Jedini predstavnik himeričnih galektina kod sisara je galektin-3. Ovaj lektin poseduje jedan CRD domen na svom C-terminusu, dok se na njegovom N-terminusu nalazi poseban nelektinski domen, koji omogućava formiranje oligomera gal-3. Tandemski galektini unutar svog polipeptidnog lanca sadrže dva CRD domena, koja se obično razlikuju po afinitetu prema određenim glikanima. Između ova dva domena nalazi se kratka peptidna sekvenca [122, 123, 149-153] (**Slika 12**). Najčešća posttranslaciona modifikacija galektina je acetilacija N-terminusa [154]. Strukturnom analizom CRD domena je pokazano da su sekundarna i tercijarna struktura ovog domena kod svih tipova galektina veoma slične [122, 149-153]. Pored toga, utvrđeno je i da CRD domen sadrži u proseku oko 130 aminokiselina, od čega su 8 aminokiselina visoko konzervirane i direktno uključene u vezivanje glikana [123, 149, 150] (**Slika 12**).



PRIMARNA STRUKTURA	
Gal-1	41 NLCL* HFNPR FNAHGD-----56 ANTI VCNS SKD-GGAWG-T EQRE -
Gal-2	KLNL* HFNPR FNS-----ESTI VCNS LD-GSNWG-Q EQRE -
Gal-3	DVAF* HFNPR FNENN-----RRVI VCNT KL-DNNWG-R EEQR -
Gal-4	DVAF* HFNPR FDG-----WDKV VFNT LQ-GGK WGSEER K-
Gal-7	DAAL* HFNPR LD-----TSEV VFNS KE-OG SWGSEER G

Slika 12. Klasifikacija galektina na osnovu njihove strukture. Zvezdice označavaju visoko konzervirane aminokiselinske ostatke u CRD domenu odgovorne za specifično vezivanje glikana. Modifikovano iz Essential of Glycobiology 2nd ed., 2009 [123].

Interakcije galektina sa glikanima su složene i nekoliko faktora doprinosi visokom afinitetu vezivanja (multivalentnost liganda, dimerizacija ili oligomerizacija galektina itd.) [123, 149, 150, 155]. Laktoza (Gal- β 1,4-Glc ili Lac) i N-acetilaktozamin (Gal- β 1,4-GlcNAc ili LacNAc) predstavljaju najjednostavnije šećere za koje se galektini vezuju, ali sa relativno niskim afinitetom [149]. Interakcije CRD domena sa ova dva disaharida su karakteristika svih galektina, stoga oni predstavljaju prirodne inhibitore njihove lektinske aktivnosti [149, 156]. Smatra se da galektini uglavnom pokazuju visok afinitet vezivanja za granate, multivalentne N-glikane sa većim brojem LacNAc ponovaka. U fiziološkim uslovima, svaki galektin prepoznaje specifične oligosaharidne ligande na glikokonjugatima i poseduje CRD domen sa najvećim afinitetom za različite šećerne strukture. Tako se na primer, gal-1 i gal-3 vezuju sa visokim afinitetom za poli-N-acetilaktozaminske sekvence, samo što je za vezivanje gal-1 neophodno prisustvo β -Gal na neredukujućem kraju

oligosaharida, dok za vezivanje gal-3 ovo nije preduslov [123, 149]. Međutim, razgranatost N-glikana može i da snizi afinitet vezivanja, kao što je to u slučaju gal-8 [149, 157].

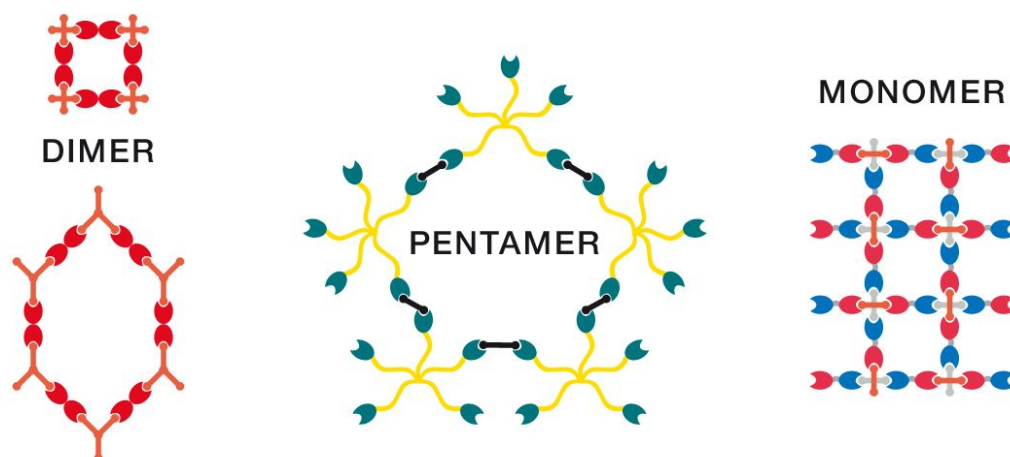
1.3.4. Funkcionalna svojstva galektina

Galektini se ispoljavaju na tkivno-specifičan način i predstavljaju proteine sa raznovrsnim biološkim funkcijama [158]. Ovi lektini ne poseduju signalnu sekvencu, koja je neophodna za sekreciju proteina preko uobičajenog sekretornog puta [154]. Ipak, galektini svoje aktivnosti ostvaruju kako unutar ćelije, tako i na površini ćelije i/ili vanćelijskom matriksu. Galektini se najverovatnije izlučuju neklasičnim putem sekrecije [123, 158, 159]. Pojedini galektini mogu biti lokalizovani i unutar jedra, po čemu su jedinstveni među svim tipovima animalnih lektina [109, 160]. Galektini ostvaruju svoje funkcije u ćeliji nelektinskim tipom interakcija (protein-protein) sa citoplazmatskim i/ili jedarnim proteinima, dok izvan ćelije oni uglavnom stupaju u interakcije tipa lektin-glikan [149, 158]. Galektini koji se sekretuju van ćelije mogu da formiraju uređene molekulske strukture tzv. **galektin-glikan rešetke** sa odgovarajućim glikokonjugatima [161] (**Slika 13**). Obrazovanjem ovakvih rešetki, galektini mogu grupisati specifične glikoproteine, sprečiti endocitozu membranskih receptora i pokrenuti različite signalne kaskade [123, 150]. Tako, npr. interakcije gal-3 sa TGF β receptorima sprečavaju njihovu endocitozu, i tako potpomažu invaziju transformisanih ćelija [162]. Pored toga, pokazano je da formiranje rešetki gal-3 sa modifikovanim N-glikanima dovodi do aktivacije $\alpha 5\beta 1$ integrina, remodeliranja fokalne adhezije i pokretanja ćelijskih signalnih puteva preko fosfatidilinozitol 3-kinaze, što sve zajedno stimuliše migraciju tumorskih ćelija [163].

PROTOTIPSKI

HIMERIČNI

TANDEMSKI



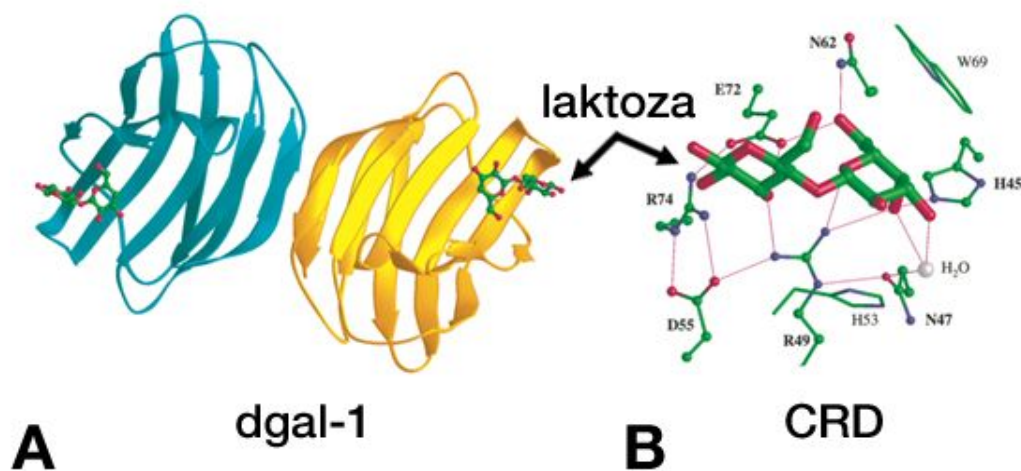
Slika 13. Različiti tipovi galektin-glikan rešetki. Modifikovano iz Rabinovich i sar., 2009 [161].

Galektini su uključeni u mnoge biološke procese (imunomodulacija, regeneracija, embriogeneza itd.), utičući na ćelijski rast, diferencijaciju, proliferaciju, apoptozu, adheziju, migraciju i invaziju ćelija, organizaciju vanćelijskog matriksa, itd. Osim u fiziološkim procesima, galektini učestvuju i u raznim patološkim procesima, kao što su alergije, kancerogeneza, nastanak metastaza različitih karcinoma, i neka neurodegenerativna oboljenja [123, 149, 158, 161, 164].

1.4. Galektin-1

1.4.1. Struktura i lokalizacija

Prvi identifikovan i najviše izučavan član galektinske familije je gal-1. Ovaj protein ostvaruje svoje biološke funkcije kao monomer (mgal-1 ~ 14.5 kDa), ili kao nekovalentni homodimer (dgal-1 ~ 29kDa). U redukujućim uslovima, gal-1 je pretežno dimer sa dva CRD domena, koji mogu da vezuju odgovarajuće glikokonjugate i tako stabilizuju dgal-1. Pri niskim koncentracijama, dgal-1 spontano disosuje u dve identične subjedinice, koje su i dalje sposobne da vezuju glikane, ali sa nižim afinitetom [148, 165, 166] (Slika 14). Nasuprot tome, u neredukujućim uslovima, gal-1 je isključivo monomer usled formiranja tri intramolekulske disulfidne veze i ne poseduje lektinsku aktivnost [167, 168].



Slika 14. Struktura galektina-1. Model gal-1 baziran na kristalografskoj analizi interakcije dgal-1 sa laktozom (A) i nekovalentno vezivanje laktoze u CRD domenu (B). Modifikovano iz Essential of Glycobiology 2nd ed., 2009 [123].

Prisustvo gal-1 je potvrđeno u mnogim tkivima i organima sisara: placenti, plućima, timusu, jetri, slezini, crevima, bubrezima, koži, skeletnim i glatkim mišićima, srcu, kostnoj srži, limfnim čvorovima, centralnom i perifernom nervnom sistemu [149, 169]. Do

promena u ekspresiji gal-1 dolazi usled različitih fizioloških i patoloških stanja. Tako je pokazano da se ekspresija gal-1 menja u endometriju tokom različitih faza menstrualnog ciklusa, pri čemu je najviši nivo gal-1 detektovan u kasnoj sekretornoj fazi ciklusa [170]. Ekspresija gal-1 je značajno povišena u mnogim organima kod različitih infekcija [171-173]. Ovaj lektin je često više eksprimiran u tumorskim ćelijama, u poređenju sa istim, netransformisanim ćelijama, i takva ekspresija gal-1 je obično u korelaciji sa agresivnošću tumora i nastankom metastaza [158, 164].

1.4.2. Biološki značaj gal-1

Galektin-1 je multifunkcionalni protein koji učestvuje u lektin-glikan i protein-protein interakcijama, i može biti lokalizovan u jedru, citoplazmi, kao i na površini ćelije i/ili u vanćelijskom matriksu. Unutar ćelije, gal-1 stupa uglavnom u protein-protein interakcije sa svojim ligandima i tako učestvuje u regulaciji nekih značajnih ćelijskih procesa, kao što je obrada primarnih transkripata iRNK [174, 175]. Sa druge strane, interakcija gal-1 sa onkogenim Ras proteinom doprinosi malignoj transformaciji ćelija [164, 176]. Na površini ćelije i u vanćelijskom prostoru, gal-1 interaguje sa nizom glikokonjugata koji sadrže granate (bi-, tri- i tetraantenne) N-glikane sa većim brojem LacNAc ponovaka [149]. Galektin-1 se vezuje za glikoproteine vanćelijskog matriksa koji sadrže poli-LacNAc sekvence sa različitim afinitetom (laminin > ćelijski fibronektin > trombospondin > serumski fibronektin > vitronektin > osteopontin) [177]. Takođe je pokazano da gal-1 učestvuje u izgradnji i remodeliranju vanćelijskog matriksa glatkomišićnih ćelija *in vitro*, i tako utiče na ćelijsku adheziju i migraciju [178, 179]. Galektin-1, kao matricelularni protein, može dvojako da modulira ćelijsku adheziju (inhibira ili stimuliše), kako normalnih, tako i tumorskih ćelija. Ova modulacija se između ostalog može ostvariti i povezivanjem transmembranskih integrinskih receptora preko gal-1 sa komponentama vanćelijskog matriksa, kao što su laminin i fibronektin [178, 180-183]. Pored toga, gal-1 može biti posrednik u homotipičnim ili heterotipičnim interakcijama između ćelija [184, 185].

Ekspresija gal-1 na membrani pojedinih karcinomskih ćelija u direktnoj je vezi sa povećanjem njihove invazivnosti [186]. Brojna istraživanja ukazuju da bi gal-1 mogao da bude pravi modulator progresije tumora, jer pored uticaja na ćelijsku adheziju i invaziju, gal-1 doprinosi i preživljavanju tumorskih ćelija, izbegavanju imunskog odgovora i angiogenezi [164]. Galektin-1 se dovodi u vezu i sa nekim neurodegenerativnim oboljenjima, a posebno je zanimljiv rezultat da aktivnost zavisi od oksidacionog stanja gal-1, pa tako oksidovani gal-1 potpomaže regeneraciju aksona perifernih nerava [167, 168, 187, 188]. Pored toga postoje podaci i o regenerativnoj sposobnosti gal-1 i u mišićnom tkivu, kao i uticaju ovog lektina na diferencijaciju mišićnih ćelija [189, 190]. U nekim slučajevima, uticaj gal-1 na ćelijske procese zavisi od njegove koncentracije, kao i od tipa ćelije. Tako je u nekim tipovima ćelija pokazano da visoke koncentracije gal-1 inhibiraju ćelijsku proliferaciju, dok niske koncentracije gal-1 stimulišu ovaj proces [191, 192]. Galektin-1 podstiče proliferaciju ćelija u različitim tkivima (krvni sudovi, slezina, jetra), međutim u nekim drugim, gal-1 ostvaruje suprotno dejstvo (neuroblast, stromalne ćelije kostne srži) [193-197].

Brojna istraživanja su pokazala imunomodulatorna svojstva gal-1 kroz njegove aktivnosti u urođenom i stečenom imunskom odgovoru. Dokumentovana je uloga gal-1 u imunotoleranciji, interakciji sa patogenima, inflamatornim procesima, regulaciji sekrecije citokina, diferencijaciji B-limfocita i apoptozi T-limfocita [161]. Osim toga, gal-1 je prisutan unutar imunološki privilegovanih mesta, kao što su placenta, mozak i testisi [198-200]. Na osnovu toga pretpostavlja se da gal-1 može biti značajan faktor u održavanju homeostaze imunskog sistema, uključujući imunotoleranciju semi-alogenog fetusa, supresiju autoimunskih reakcija, kao i sprečavanje različitih infekcija.

Korišćenjem tehnologije rekombinantne DNK na embrionalnim stem ćelijama miša, dobijen je soj koji ne eksprimira gal-1, čime je omogućeno ispitivanje uticaja gal-1 na razviće, preživljavanje i fertilitet ovih jedinki *in vivo*. Nije pokazano da gal-1 ima uticaj na preživljavanje i fertilitet ovih mutanata pod normalnim laboratorijskim uslovima [201]. Detaljnijom analizom miševa su ipak utvrđene neke anomalije u razviću olfaktornih neurona kao posledica nedostatka gal-1 [202]. Zbog velikog broja galektina u tkivima sisara, i činjenice da se obrasci njihove ekspresije često znatno poklapaju, ne može se

isključiti mogućnost funkcionalnog preklapanja gal-1 i drugih članova ove familije lektina [203, 204]. Iako je pokazano da odsustvo gal-1 nije fatalno, niti dovodi do reproduktivnih posledica kod miša, pretpostavlja se da gal-1 funkcioniše kao optimizujući molekul tokom razvića [205].

1.4.3. Ekspresija i uloga gal-1 u placenti

Galektin-1 je prisutan u normalnoj placenti čoveka tokom čitave trudnoće [198, 206-210]. Pokazano je da u placenti prvog trimestra trudnoće gal-1 ispoljavaju ekstravilusne citotrofoblastne ćelije medijalnog i distalnog dela ćelijskog stuba sidrećih resica, kao i sinciotrofoblast, dok je u intersticijalnom i endovaskularnom trofoblastu gal-1 prisutan u manjoj meri [206-210]. U vilusnom citotrofoblastu i ćelijama proksimalnog citotrofoblastnog stuba gal-1 nije imunolokalizovan [209]. Povrh toga, potvrđena je visoka ekspresija ovog lektina u endometrijum, kao i unutar decidue tokom rane trudnoće [170, 208]. Galektin-1 ispoljavaju i ćelije trofoblasta u primarnoj kulturi, imortalizovana ćelijska linija HTR-8/SVneo, kao i horiokarcinomske ćelijske linije BeWo, JAr i Jeg3 [209, 211-213].

Osim gal-1, još dva galektina (gal-3 i gal-13) su eksprimirani na proteinskom nivou u normalnoj placenti čoveka. Za razliku od gal-1, gal-3 je prisutan u vilusnom citotrofoblastu, i ne ispoljava ga sinciotrofoblast. Nasuprot tome, ustanovljeno je izuzetno poklapanje u ekspresiji ova dva galektina u ekstravilusnom trofoblastu [208-210, 214]. Galektin-13 je detektovan samo u sinciotrofoblastu [215]. Na nivou iRNK, u trofoblastu su još eksprimirani i gal-14,-16 i -17 [216].

Do promena u ekspresiji gal-1 unutar placente dolazi u različitim patološkim stanjima koja uključuju trofoblast. Tako je pokazano, da kod ranog gubitka trudnoće, dolazi do smanjenja ekspresije ovog proteina u placenti [217]. Sa druge strane, gal-1 je visoko eksprimiran u ekstravilusnom trofoblastu tokom preeklampsije [218]. Povišen nivo ekspresije gal-1 zabeležen je i u trofoblastnim malignim bolestima [210].

Može se reći da je uloga gal-1 u trofoblastu čoveka nedovoljno ispitana. Ipak, postoji niz dokumentovanih podataka o ulozi ovog proteina u implantaciji mišjeg embriona *in vivo*. Kod miša je detektovana ekspresija gal-1 u trofektodermu preimplantacione blastociste, međutim, kao što je već istaknuto mutanti koji ne mogu da sintetišu ovaj lektin su i dalje bili viabilni i fertilni [117, 201, 219, 220]. Novija *in vivo* istraživanja na miševima su ipak ustanovila značajnu ulogu gal-1 u održavanju trudnoće [221]. Tako je pokazano da soj miševa koji nema sposobnost sinteze gal-1, ima veću stopu neuspešnih trudnoća u poređenju sa divljim sojem, kao i da tretman mutantnog soja rekombinantnim gal-1 sprečava gubitak fetusa. Na osnovu toga se smatra da gal-1 predstavlja jedan od ključnih faktora koji doprinosi imunotoleranciji u zoni interakcije majke i fetusa [221, 150]. Uticaj gal-1 na produkciju steroidnih hormona pokazan je u više *in vitro* model sistema [211, 222], dok ekspresiju decidualnog gal-1 kod miša reguliše progesteron, koji takođe značajno doprinosi održavanju trudnoće [221, 223]. Stoga se pretpostavlja da gal-1 može igrati značajnu ulogu u dinamičnoj komunikaciji između imunskog i endokrinog sistema, koja je ključna za uspešnost trudnoće [221].

Dosadašnja ispitivanja uloge gal-1 u trofoblastu čoveka uglavnom su se odnosila na kolokalizaciju i interakciju sa njegovim fiziološkim ligandima. Kao što je već pomenuto, ćelije EVT duž invazivnog puta diferencijacije sintetišu vanćelijski matriks, koji sadrži onfFN i LN, endogene ligande gal-1. Ozeki i saradnici su potvrdili kolokalizaciju gal-1 sa onfFN i LN u placenti čoveka, ali i njegovo vezivanje za ove glikoproteine [224]. Pokazano je da gal-1 vezuje i Thomsen-Friedenreich (TF) antigen, koji je između ostalog prisutan i na transmembranskom mucinu MUC1, koga ekspimiraju sinciciotrofoblast, EVT i horiokarcinomske BeWo ćelije [225-227]. Pored toga, gal-1 utiče inhibitorno na proliferaciju horiokarcinomskih BeWo ćelija [222] i podstiče sincicijalizaciju trofoblastnih ćelija *in vitro* [228]. Ranija istraživanja naše laboratorije su pokazala da laktoza, inhibitorni šećer za lektinski tip interakcija galektina, smanjuje invaziju ekstravilusnih trofoblastnih HTR-8/SVneo ćelija *in vitro* [213]. Na osnovu svega navedenog, postoji mogućnost da gal-1 može učestvovati u nekim ćelijskim procesima koji su ključni za implantaciju embriona i formiranje funkcionalne placente, što je i ispitivano ovim doktorskim radom.

CILJ ISTRAŽIVANJA

Značaj gal-1 za funkcionalna svojstva trofoblata čoveka je nedovoljno ispitan. Uloga ovog lektina u održavanju trudnoće je pokazana prvenstveno u *in vivo* eksperimentima na mišjem modelu. Dosadašnji podaci o gal-1 u placenti čoveka uglavnom se odnose na njegovu lokalizaciju u normalnom i transformisanom trofoblastu, kao i na kolokalizaciju i interakciju sa poznatim ligandima, onfFN i LN. Pored toga, gal-1 je prisutan i u decidui tokom trudnoće, tako da je invazivni trofoblast u procesu implantacije izložen sopstvenom i majčinskom gal-1. Novija *in vitro* istraživanja su pokazala značaj gal-1 za neke ćelijske funkcije trofoblata, dok nije ispitan uticaj na migratorna i invazivna svojstva normalnog trofoblata.

Zbog toga su u ovom radu postavljeni sledeći ciljevi istraživanja:

- 1. Ispitivanje uticaja endogenog gal-1 na funkcionalna svojstva trofoblata čoveka *in vitro*,**
- 2. Ispitivanje uticaja egzogenog gal-1 na funkcionalna svojstva trofoblata čoveka *in vitro*,**
- 3. Ispitivanje značaja lektinskog tipa interakcija za adheziju, migraciju i invaziju trofoblata *in vitro*,**
- 4. Utvrđivanje galektinskog profila invazivnog trofoblata.**

MATERIJAL I METODE

3.1. Tkivo

Za ispitivanja u ovom radu je korišćeno tkivo normalne placente gestacijske starosti 6 do 12 nedelja. Tkivni uzorci su dobijeni nakon legalnih prekida trudnoće u Ginekološko-akušerskoj klinici Kliničkog centra Srbije i/ili u Vojnomedicinskoj akademiji (obe ustanove su sa sedištem u Beogradu). Tkivo placente je korišćeno za izolovanje citotrofoblastnih ćelija, kao i za imunohistohemijska bojenja.

3.1.1. Smrznuti iseći

Kulture eksplanata placente pripremane su po metodi koju su opisali Aplin i saradnici [229]. Tkivo placente prvog trimestra je ispirano u sterilnom 0.05 M fosfatnom puferu pH 7,2 (sPBS), i sakupljani su terminalni delovi horionskih resica. Po 100 µl kolagena tipa I (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) je razliveno u obliku čepića na dno bunara u pločama sa 24 mesta (Sarstedt AG. & Co., Nümbrecht, Germany) na 4°C i ostavljeno 30 min. na sobnoj temperaturi da gelira. Horionske resice su zatim postavljane u radijalnom položaju na gelirane kolagenske čepiće i prelivane kapljicom (oko 50 µl) medijuma DMEM/F12 (Sigma, St Louis, MO, USA), koji sadrži 10% fetalnog telećeg seruma (FCS) (PAA Laboratories, Linz, Austria). Nakon 2 h adhezije na 37°C. Po isteku faze adhezije, resice su prelivane sa 600 µl kompletnog DMEM/F12 medijuma sa antitelima prema gal-1 (15 µg/ml) koja blokiraju i njegovu funkciju (Kyowa Hakko Kirin Company, Tokyo, Japan) [230], ili sa neimunim kunićevim IgG u istoj koncentraciji (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) i inkubirane 48 h na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Nakon inkubacije uklonjen je medijum, a eksplanti na kolagenu su smrznuti u tečnom azotu korišćenjem medijuma Tissue-Tek[®] O.C.T.[™] (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Nederland). Za imunohistohemiju su korišćeni tkivni iseći debljine 5µm napravljeni na kriotomu Leica CM1850 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) i

pri temperaturi od -21°C fiksirani na mikroskopske pločice obložene poli-L-lizinom (Sigma, St. Louis, MO, USA).

3.2. Antitela

U ovim istraživanjima su korišćena različita primarna (monoklonska i poliklonska) antitela, koja su prikazana zajedno sa izvedenim imunohemijskim tehnikama i odgovarajućim razblaženjima u kojima su upotrebljena u **Tabeli I**. Kao sekundarna antitela u ovom radu korišćena su:

- Konjski anti-miš IgG, kozji anti-kunić IgG i kunićev anti-koza IgG, obeleženi biotinom (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).
- AlexaFluor®488 F(ab') fragment kozjih anti-miš antitela i AlexaFluor®555 F(ab') fragment kozjih anti-kunić antitela (Molecular Probes, Inc., Invitrogen™, Eugene, OR, USA).
- Texas Red® kunićev anti-koza IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Tabela I. Pregled primarnih monoklonskih i poliklonskih antitela

Primarno antitelo	Tip antitela	Tehnike i razblaženja	Proizvođač
anti-citokeratin-7 (CK-7)	monoklonsko	imunocitohemija 1/75 imunohistohemija 1/150	Dako, Glostrup, Denmark
anti-citokeratin-18 (CK-18)	monoklonsko	imunocitohemija 1/6000	Sigma, St. Louis, MO, USA
anti-CD-45	monoklonsko	prečišćavanje CT 1/100 imunocitohemija 1/100	AbD Serotec, Raleigh, NC, USA
anti-gal-1 (blokiranju i funkciju gal-1)	poliklonsko	imunocitohemija 1/100 imunohistohemija 1/500 imunoblot 1/2500 MTT test (1 i 5 µg/ml) testovi adhezije, migracije i invazije (1 i/ili 5 µg/ml)	Kyowa Hakko Kirin Company, Tokyo, Japan
anti-gal-3	monoklonsko	imunoblot 1/10	Dr Margaret E. Huflejt
anti-gal-8	poliklonsko	imunocitohemija 1/150 imunohistohemija 1/500 imunoblot 1/500	R&D, Abingdon, UK
anti-β-aktin	poliklonsko	imunoblot 1/1500	Sigma, St. Louis, MO, USA

3.3. Kulture trofoblastnih ćelija

Danas se pored izolovanog citotrofoblasta (CT) u *in vitro* istraživanjima koristi i veliki broj različitih trofoblastnih ćelijskih linija. U ovom radu obavljena su ispitivanja na ćelijama citotrofoblasta izolovanim iz placenti prvog trimestra normalne trudnoće, imortalizovanoj ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo, i u manjoj meri na horiokarcinomskoj ćelijskoj liniji JAr.

3.3.1. Kultura izolovanog citotrofoblasta

Citotrofoblastne ćelije su izolovane prema proceduri koju su opisali Vićovac i saradnici [231], sa manjim modifikacijama. Placenta prvog trimestra je ispirana u sterilnom PBS-u (sPBS) koji sadrži i gentamicin. Tkivo placentе je podvrgnuto enzimskoj digestiji u 0.25% tripsinu (Torlak, Beograd, Srbija) sa 0,2 mg/ml DNase (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) i 5 mM MgCl₂ na 37°C (2 ciklusa po 25 min.). Nakon svakog ciklusa ćelije su filtrirane kroz najlonsko sito (40 µm, Nylon Bolting Cloth, Warrington, UK), a dejstvo tripsina je blokirano FCS-om. Ćelije su ispirane hladnim sPBS-om koji je sadržao 0,1% BSA i separisane centrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu Percoll-a (5 ml 20%, 5 ml 35% i 2,5 ml 50%, Pharmacia Biotech AB, Stockholm, Sweden) 30 min. na 2800 rpm, pri temperaturi od 10°C. Ćelije srednjeg sloja gradijenta su prikupljane i ispirane, a zatim je određivan njihov broj, vijabilnost i čistoća. Ove ćelije su identifikovane kao trofoblast naknadnim imunocitohemijskim bojenjem na citokeratin, ali je uočeno i prisustvo imunskih ćelija. Za dalje prečišćavanje CT ćelija korišćene su magnetne kuglice Dynabeads® M-280 Sheep Anti-Mouse IgG (Molecular Probes, Inc., Invitrogen™, Eugene, OR, USA) na kojima su imobilisana anti-CD45 antitela. Ćelije su inkubirane sa ovim antitelima 1 h na rotacionoj platformi na 4°C. Eliminacija kuglica sa vezanim CD45-pozitivnim ćelijama koje vode poreklo iz kostne srži obavljena je pomoću magnetna. Procena čistoće vršena je brojanjem ćelija pod svetlosnim mikroskopom nakon imunocitohemijskog bojenja citospinova prečišćenih ćelija sa antitelima prema CK-7 i

CD45. Čistoća je bila oko 95%. Citotrofoblastne ćelije su gajene u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂ u vazduhu, na 37°C u DMEM/F12 medijumu (Sigma, St Louis, MO, USA) koji sadrži 10% FCS. Za potrebe imunocitohemijskih ispitivanja, CT ćelije su gajene na pokrovnim stakalcima (Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co., Braunschweig, Germany) preko noći, fiksirane ledenim aceton-metanolom (1:1) i čuvane na -20°C do bojenja. Pored toga, izolovane CT ćelije su korišćene i u funkcionalnom *in vitro* testu ćelijske invazije.

3.3.2. Kultura ekstravilusne trofoblastne ćelijske linije HTR-8/SVneo

S obzirom na činjenicu da izolovane citotrofoblastne ćelije u kulturi ne proliferišu, već nakon relativno kratkog vremenskog intervala gube ekstravilusni fenotip, bilo je neophodno za potrebe ovog istraživanja prevazići ograničenja primarne kulture citotrofoblasta korišćenjem ćelijske linije HTR-8/SVneo. Trofoblastna ćelijska linija HTR-8/SVneo dobijena je ljubaznošću Charles H. Graham-a (Queen's University, Kingston, ON, Canada) i nastala je transfekcijom ekstravilusnih ćelija placente čoveka prvog trimestra trudnoće SV40 T antigenom [78, 232]. HTR-8/SVneo je proliferativna i invazivna ćelijska linija koja eksprimira markere normalnog ekstravilusnog trofoblasta čoveka [233]. Ove ćelije su gajene u RPMI 1640 (PAA Laboratories, Linz, Austria) medijumu sa 5% FCS i mešavinom antibiotika penicilina G, streptomycin sulfata i antimikotika amfotericina B (Sigma, St Louis, MO, USA), što predstavlja kompletan medijum. Ćelije su gajene u plastičnim Falcon flaskovima (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), pri temperaturi od 37°C i u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. HTR-8/SVneo ćelije su korišćene u imunocitohemijskom ispitivanju, Western blot analizi proteina, RT-PCR analizi, MTT testu, kao i u funkcionalnim *in vitro* testovima ćelijske adhezije, migracije i invazije.

3.3.3. Kultura horiokarcinomske ćelijske linije JAr

Horiokarcinomska ćelijska linija JAr nabavljena je od American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Ove ćelije su gajene u DMEM/F12 medijumu koji sadrži 10% FCS i mešavinu antibiotika penicilina G, streptomycin sulfata i antimikotika amfotericina B. JAr ćelije su korišćene u imunocitohemijskom ispitivanju, MTT testu, kao i u *in vitro* testovima ćelijske adhezije i migracije.

3.4. Imunohistohemija

Za imunohistohemijske analize korišćeni su parafinski i smrznuti isecci tkiva normalne placente prvog trimestra. Parafinski isecci su deparafinisani u ksilolu (10 min.), a nakon toga rehidratirani kroz seriju alkohola. Aktivnost endogenih peroksidaza je blokirana 1% rastvorom H₂O₂ u etanolu tokom 30 min. na sobnoj temperaturi, a zatim su isecci ispirani u 70% etanolu, destilovanoj vodi (dH₂O) i PBS-u. Nespecifično vezivanje je blokirano 1% kazeinom. Tkivni isecci su inkubirani preko noći na 4°C sa primarnim antitelima prema CK-7, gal-1 i gal-8 u odgovarajućim razblaženjima (**Tabela I**). Nakon ispiranja u PBS-u isecci su inkubirani sa odgovarajućim biotinizovanim konjskim anti-miš IgG (CK-7), kozjim anti-kunić IgG (gal-1) i kunićevim anti-koza IgG (gal-8) ili u slučaju fluorescentnog bojenja anti-kunić AlexaFluor[®]555 (gal-1) sekundarnim antitelima 30 min. na sobnoj temperaturi. U sledećem koraku parafinski isecci su inkubirani sa Vectastain Elite ABC reagensom, ispirani i obojeni DAB-om, a zatim dehidratirani i montirani korišćenjem VectaMount Permanent Mounting smole (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Fluorescentno bojene preparati su montirani u medijumu ProLong[®] Gold Antifade Reagent (Molecular Probes, Inc., Invitrogen[™], Eugene, OR, USA). Jedra su kontrastirana hematoksilinom u slučaju vizuelizacije DAB-om, odnosno 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) reagensom (ProLong[®] Gold Antifade Reagent) u slučaju imunofluorescentnog bojenja. Dobijeni preparati su analizirani korišćenjem Carl Zeiss Axio Imager 1.0

mikroskopa sa AxioCam HR monohromatskom kamerom (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), ili sa Canon A640 digitalnom kamerom (Canon Inc., Tokyo, Japan). Kontrole su inkubirane sa odgovarajućim neimunim serumom, umesto primarnih antitela, što je rezultovalo potpunim odsustvom bojene reakcije.

3.5. Imunocitohemija

Pokrovna stakalca sa fiksiranim (ledeni aceton-metanol) ćelijama CT iz primarne kulture, HTR-8/SVneo ćelijama i horiokarcinomskim JAr ćelijama su rehidratirane u PBS-u, a zatim je blokirana aktivnost endogenih peroksidaza 1% rastvorom H₂O₂ tokom 30 min. na sobnoj temperaturi. Nespecifično vezivanje je blokirano 1% kazeinom u PBS-u tokom 20 min. na sobnoj temperaturi. Ćelije su inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelima:

izolovane CT ćelije sa antitelima prema: CK-7 (1 h na sobnoj temperaturi), gal-1 (preko noći na 4°C), i gal-8 (1 h na sobnoj temperaturi);

HTR-8/SVneo ćelije sa antitelima prema: CK-18 (1 h na sobnoj temperaturi), gal-1 (preko noći na 4°C), i gal-8 (1 h na sobnoj temperaturi);

JAr ćelije sa antitelima prema gal-1 (preko noći na 4°C);

Posle ispiranja PBS-om, izolovane CT ćelije su inkubirane 30 min. na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim konjskim anti-miš IgG (CK-7), dok su JAr ćelije inkubirane kozjim anti-kunić IgG antitelima (gal-1). U sledećem koraku ćelije su inkubirane Vectastain Elite ABC reagensom 30 min., reakcija je zatim vizuelizovana DAB-om, a nakon toga su preparati dehidratirani i montirani korišćenjem VectaMount Permanent Mounting smole. U slučaju fluorescentnog imunocitohemijskog bojenja, HTR-8/SVneo ćelije su inkubirane u mraku 30 min. na sobnoj temperaturi sa sekundarnim anti-miš AlexaFluor[®]488 (CK-18), anti-kunić AlexaFluor[®]555 (gal-1) i Texas Red[®] anti-koza IgG (gal-8) antitelima. Izolovane citotrofoblastne ćelije, prethodno identifikovane korišćenjem antitela prema CK-7, su fluorescentno bojene pomoću sekundarnih anti-kunić AlexaFluor[®]555 (gal-1) i Texas Red[®] anti-koza IgG (gal-8) antitela. Kada su korišćena

sekundarna antitela obeležena odgovarajućom fluorescentnom bojom, bojena su i jedra ćelija DAPI reagensom. Dobijeni preparati su analizirani i fotografisani na isti način kao i obojeni isečci tkiva. Kontrole su inkubirane sa odgovarajućim neimunim serumom, umesto sa primarnim antitelima, što je rezultovalo potpunim odsustvom bojene reakcije.

3.6. SDS poliakrilamidna gel-elektroforeza i Western blot analiza

Lizati izolovanog CT i HTR-8/SVneo ćelija su razdvajani u 15% akrilamidnom gelu u redukujućim uslovima u Mini/PROTEAN[®] 3 Cell sistemu (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), pri parametrima: 150 V, 80 mA, 12 W. Proteini su prenošeni na nitroceluloznu membranu pomoću sistema za transfer Trans-Blot[®] SD Semidry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Nespecifično vezivanje je blokirano preko noći 1% kazeinom u PBS-u. Blokirane membrane su inkubirane sa antitelima prema ispitivanim gal-1, -3 i -8 i β -aktinu („loading” kontrola), u razblaženjima navedenim u **Tabeli I**, uz stalno mešanje preko noći na 4°C. Nakon ispiranja PBS-om, membrane su inkubirane sa odgovarajućim biotinizovanim sekundarnim antitelima, 30 min. na sobnoj temperaturi. Vezivanje je detektovano upotrebom DAB-a kao hromogena.

3.7. RT-PCR analiza

Izolovana je ukupna RNK iz lizata izolovanog CT i HTR-8/SVneo ćelija, i od 2 μ g ukupne RNK dobijen je komplementarni lanac DNK (cDNA) korišćenjem dNTP (Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA, USA), heksamernih prajmera i RevertAid reverzne transkriptaze (Fermentas AB, Vilnius, Lithuania). Zatim je izvršena PCR amplifikacija gena koji kodiraju gal-1, -3 i -8 korišćenjem dobijene cDNA, dNTP, odgovarajućih prajmera (gal-1, -2, -3, -4, -7, -8, -9, -10, -12, -13, -14) koje su prethodno upotrebili

Thijssen i saradnici [234] i AmpliTaq Gold DNA polimeraze (Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA, USA). Temperaturni režim ove PCR reakcije podrazumevao je inicijalnu denaturaciju na 95°C tokom 10 min., a zatim 35 temperaturna ciklusa (1 min. na 95°C, 1 min. na 60°C i 2 min. na 72°C) i završnu fazu na 72°C u trajanju od 10 minuta. PCR produkti su razdvojeni elektroforezom na 2% agaroznom gelu i vizuelizovani etidijum bromidom na UV svetlu.

3.8. Detekcija i kvantitacija ćelija (MTT test)

Vijabilnost ćelija je određivana MTT testom (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazol bromid, Sigma, St Louis, MO, USA) u mikrotitarskoj ploči sa 96 mesta (Sarstedt AG. & Co., Nümbrecht, Germany) prema opisanoj proceduri [235]. Ispitivan je mogući uticaj 100 mM rastvora šećera (manoza, N-acetilglukozamin i laktoza) na vijabilnost HTR-8/SVneo i JAr ćelija u odgovarajućem medijumu (RPMI 1640 za HTR-8/SVneo ćelije i DMEM/F12 za JAr ćelije) koji sadrži 0,1% BSA. Uticaj endogenog gal-1 na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija ispitivan je korišćenjem 1 i 5 µg/ml antitela prema galektinu-1 koja blokiraju i njegovu funkciju (anti-gal-1), pri čemu je neimuni IgG korišćen kao kontrola. Pored toga, ispitivan je i mogući uticaj egzogenog gal-1 na vijabilnost ovih ćelija upotrebom različitih koncentracija (1, 100 i 1000 ng/ml) dve molekulske forme rekombinantnog humanog gal-1 (rhgal-1), od kojih jedna poseduje lektinsku aktivnost (CS-gal-1), a druga ne (Ox-gal-1) (Kyowa Hakko Kirin Company, Tokyo, Japan). Nakon 24 ili 48 h inkubacije sa odgovarajućim tretmanima, ćelije su ispirane PBS-om, a zatim im je dodavano 100 µl MTT (1 mg/ml) u PBS-u sa 10% FCS i inkubirano 2 h na 37°C. Rastvor MTT-a je uklanjao, a u svaki bunar je dodavano po 100 µl 1-propanola (Chemapol, Prague, Czech Republic). Nakon rastvaranja istaložene boje merena je optička gustina na 540 nm, a broj živih ćelija nakon tretmana je očitavan sa standardne prave sa 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 , 6×10^4 , 8×10^4 ćelija/bunaru. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta, sa $n=6$ u svakom ogledu.

3.9. Funkcionalni *in vitro* testovi

3.9.1. Test ćelijske adhezije

Test adhezije HTR-8/SVneo i JAr ćelija je izvođen na način opisan u literaturi [236]. Mikrotitarske ploče sa 96 mesta su oblagane Matrigelom (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 50 µl/bunaru koncentracije 200 µg/ml u osnovnom RPMI 1640 ili DMEM/F12 medijumu, i ostavljene 2 h na sobnoj temperaturi da Matrigel gelira. Nakon inkubacije bunari su ispirani PBS-om, a nespecifično vezivanje blokirano 1% BSA u PBS-u (inaktiviranog na 70°C) tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Ćelije su preinkubirane u potpunom ili osnovnom medijumu (RPMI 1640 za HTR-8/SVneo ćelije ili DMEM/F12 za JAr ćelije) sa ili bez tretmana (kontrola), tokom 1 h uz povremeno mešanje na 37°C. Obe ćelijske linije su tretirane 100 mM rastvorima manoze, N-acetilglukozamina i laktoze, kao i anti-gal-1 antitelima (neimuni IgG je korišćen kao kontrola) u dve koncentracije (1 i 5 µg/ml). Po 50 µl preinkubirane ćelijske suspenzije koja je sadržala 5×10^4 ćelija dodavano je u svaki bunar mikrotitarske ploče. Posle 1 h inkubacije na 37°C i ispiranja PBS-om, ćelije su fiksirane 4% paraformaldehidom tokom 10 minuta. Nakon toga, ćelije su bojene 0,1% rastvorom Coomassie Brilliant Blue (Sigma, St Louis, MO, USA) tokom 10 min., a zatim obezbojavane rastvorom 30% metanola i 10% glacijalne sirćetne kiseline. Adherirane ćelije su lizirane 1% rastvorom SDS-a, a optička gustina je merena na 620 nm. Eksperiment je ponovljen tri puta, sa n=6 u svakom ogledu.

3.9.2. Test ćelijske migracije

Za ispitivanje migratornih sposobnosti trofoblasta *in vitro* korišćena su dva različita testa - „wound healing“ i „transwell“ test migracije. HTR-8/SVneo ćelije su gajene u pločama sa 6 bunara (Sarstedt AG. & Co., Nümbrecht, Germany) u potpunom RPMI

1640 medijumu do konfluentnosti. Čelijski sloj je ogoljen pomoću sterilnog nastavka pipete (“wound healing”, eng. wounding – povređivanje i healing - zarašćivanje). Bunari su zatim ispirani sPBS-om i ćelije su inkubirane 24 h na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂ u potpunom RPMI 1640 medijumu bez (kontrola), sa 100mM laktozom, ili sa 5 µg/ml anti-gal-1 antitela (neimuni IgG je korišćen kao kontrola). Čelije su fotografisane odmah po ozleđivanju (0 h), kao i nakon 24 h inkubacije, i meren je pređeni put, tj. “zarašćivanje” ozlede ćelijskog sloja . Eksperimenti su urađeni najmanje tri puta.

U kulturi horiokarcinomskih JAr ćelija korišćen je drugačiji test sistem (“transwell” test migracije) i izvođen je prema opisanoj proceduri [237]. Ploče sa 24 mesta (Sarstedt AG. & Co., Nümbrecht, Germany) su oblagane sa 250 µl Matrigela (1 mg/ml) u osnovnom DMEM/F12 medijumu. U ploču sa Matrigelom su stavljeni umeci za ćelijsku kulturu dijametra pora 8 µm (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Nakon 1 h na sobnoj temperaturi, umeci i ploče su ispirani sPBS-om, a zatim je u gornju komoru nanešeno 200 µl suspenzije sa 5x10⁴ JAr ćelija u osnovnom DMEM/F12 medijumu koji sadrži 0,1% BSA bez (kontrola) ili sa 100 mM manozom, N-acetilglukozaminom i laktozom. Po 500 µl odgovarajućeg DMEM/F12 medijuma je dodavano i u donju komoru. Nakon inkubacije od 24 h na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂, umeci su pažljivo ispirani PBS-om, a preostale ćelije u gornjoj komori brisane pamučnim tupferom. Donje strane umetaka, kao i sama ploča bojene su kristal violetom tokom 10 min. i ispirani PBS-om. Obojene ćelije su lizirane sa 100 µl 33% glacijalne sirćetne kiseline, i merena je optička gustina na 540 nm. Eksperiment je ponovljen tri puta.

3.9.3. Test ćelijske invazije

Ćelijska invazija CT i HTR-8/SVneo ćelija je ispitivana po metodi koju su opisali Librach i saradnici [95]. Umeci za ćelijsku kulturu sa dijametrom pora od 8 µm oblagani su sa 10 µl Matrigela (1:2) u osnovnom DMEM/F12 medijumu (izolovani citotrofoblast) i osnovnom RPMI 1640 medijumu za HTR-8/SVneo ćelije. Matrigel je ostavljan da gelira 30 min. na 37°C. U gornju komoru umetka nanošeno je 200 µl suspenzije sa 2x10⁵ CT ćelija ili

1×10^5 HTR-8/SVneo ćelija u osnovnom medijumu koji sadrži 0,1% BSA sa ili bez tretmana (kontrola). Izolovane citotrofoblastne ćelije su tretirane 100 mM laktozom, 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-gal-1 antitelima (neimuni IgG je korišćen kao kontrola), kao i različitim molekulskim formama rhgal-1 (CS-gal-1 i Ox-gal-1) u koncentracijama 1 ng/ml i 1 $\mu\text{g/ml}$. HTR-8/SVneo ćelije su tretirane anti-gal-1 antitelima (1 i 5 $\mu\text{g/ml}$), dvema molekulskim formama rhgal-1 (1 $\mu\text{g/ml}$), kao i sa smešom rhgal-1 i laktoze (1 $\mu\text{g/ml}$ CS-gal-1 ili 1 $\mu\text{g/ml}$ Ox-gal-1 sa 100 mM laktozom). Po 500 μl odgovarajućeg medijuma je dodato i u donju komoru. Nakon inkubacije od 24 h na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂, medijum je uklonjen, a ćelije su ispirane PBS-om. Gornja površina membrane je brisana pamučnim tupferom, a ćelije na donjoj površini su fiksirane ledenim acetom-metanolom (1:1) tokom 10 minuta. Membrane su odstranjivane skalpelom, a ćelije na njima bojene su imunocitohemijski monoklonskim antitelom prema CK-7 u slučaju izolovanog CT, i Gimzom u slučaju HTR-8/SVneo ćelija. Ćelije u porama, ili na donjoj strani membrane brojane su pod svetlosnim mikroskopom na celoj površini membrane. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta u duplikatu.

3.10. Statistička analiza i evaluacija imunohistohemijskog bojenja

Dobijeni podaci su statistički obrađeni u programu Primer of Biostatistics Statistical Software Program 5.0 (The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY, USA) upotrebom neparametrijskog Mann-Whitney testa, ANOVA testa i Studentovog t-testa.

Imunohistohemijsko bojenje ispitivanih isečaka tkiva evaluirano je prema semikvantitativnoj metodi [210, 231] na osnovu intenziteta bojenja.

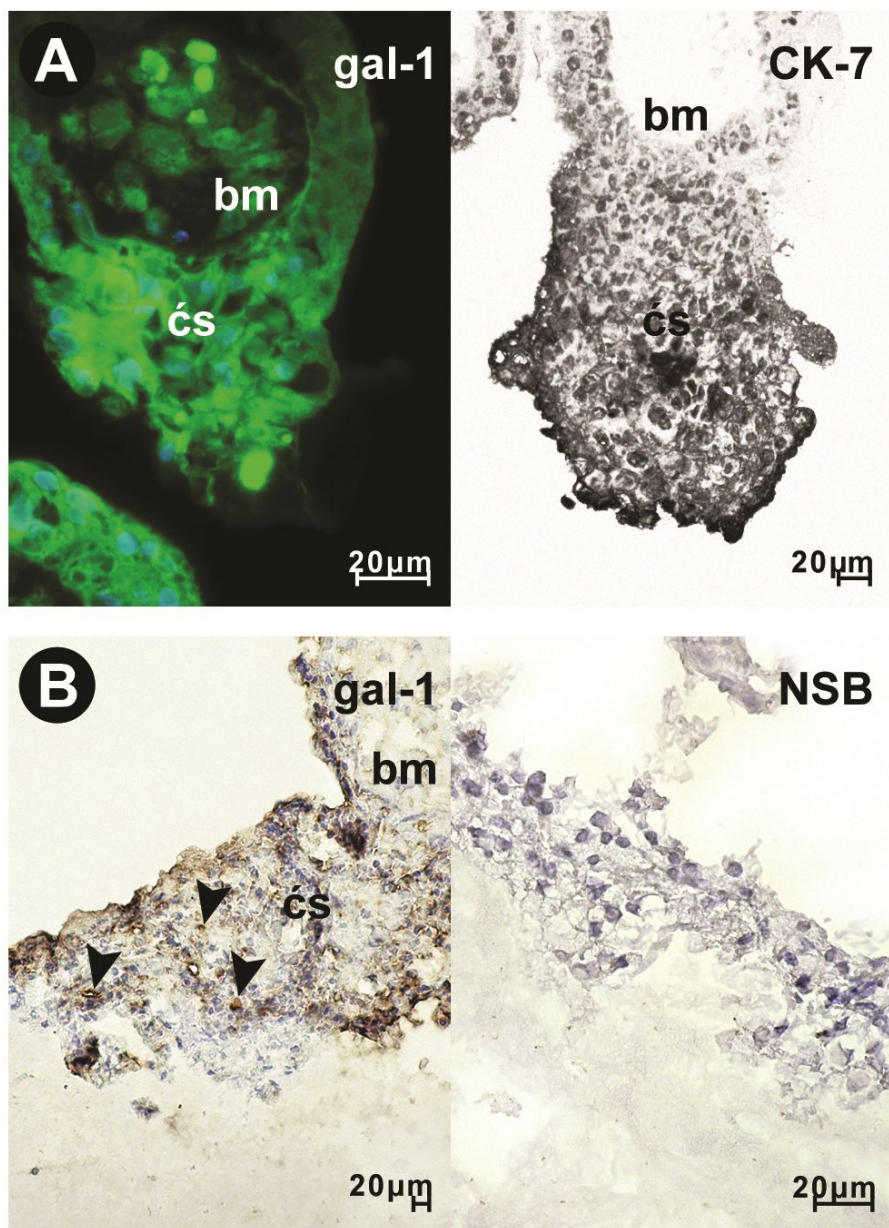
REZULTATI

4.1. Galektinski profil invazivnog trofoblasta čoveka

U dostupnoj literaturi postoje podaci o imunolokalizaciji gal-1, kao i gal-3 u trofoblastu normalne placente čoveka, citotrofoblastnim ćelijama izolovanim iz placenti prvog trimestra normalne trudnoće, HTR-8/SVneo ćelijama, kao i u horiokarcinomskim ćelijskim linijama BeWo, JAr i Jeg3 [198, 206-213]. U ovim istraživanjima su po prvi put korišćena poliklonska antitela prema gal-1 koja blokiraju i funkciju gal-1, što je pokazano u drugim model sistemima [230]. Da bi se ispitala specifičnost ovih antitela u trofoblastu vršena su imunohistohemijska bojenja isečaka tkiva normalne placente prvog trimestra, kao i imunocitohemijska bojenja izolovanog CT, HTR-8/SVneo ćelija i horiokarcinomskih JAr ćelija. Potvrda prethodno pokazane imunolokalizacije gal-1 u EVT pomoću ovih antitela, učinila bi ih pogodnim za dalja ispitivanja korišćenjem funkcionalnih *in vitro* testova. U nastojanju da se potpunije ispita značaj gal-1 za funkcionalna svojstva trofoblasta čoveka *in vitro*, bilo je potrebno izvršiti detekciju svih galektina eksprimiranih na nivou iRNK i proteina u invazivnom trofoblastu, tj. u izolovanom CT i HTR-8/SVneo ćelijama.

4.1.1. Imunolokalizacija gal-1 u tkivu normalne placente prvog trimestra

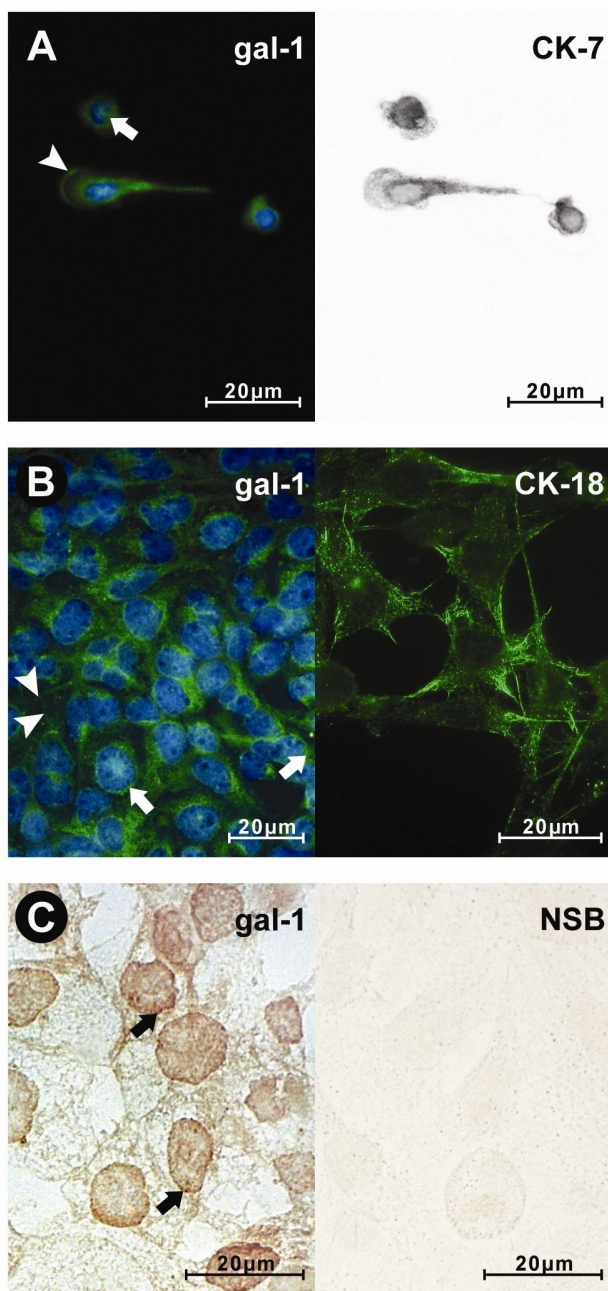
Ekspresija gal-1 u tkivu normalne placente ispitivana je na parafinskim isečcima tkiva placente, kao i na smrznutim isečcima eksplanata placente prvog trimestra gajenim na kolagenu. Pokazano je da gal-1 ispoljavaju sinciciotrofoblast i EVT ćelije citotrofoblastnog ćelijskog stuba (citoplazmatsko i membransko bojenje). Na parafinskim rezovima potvrđena je lokalizacija gal-1 u ekstravilusnom trofoblastu ćelijskih stubova sidrećih resica, a ćelije trofoblasta su identifikovane bojenjem na CK-7 (**Slika 15A**). Trofoblastne ćelije eksplanata placente, koji su prethodno u kulturi tretirani antitelima prema gal-1 (15 µg/ml) su specifično obojene, za razliku od eksplanata tretiranih neimunim kunićevim IgG (15 µg/ml), gde trofoblast nije obojen (**Slika 15B**).



Slika 15. Imunolokalizacija gal-1 u tkivu normalne placente prvog trimestra. Bojenja parafinskih isečaka tkiva placente (**A, levo**) i smrznutih isečaka eksplanata placente posle kulture na gelu kolagena tipa I (**B, levo**) na gal-1. Identifikacija trofoblastnih ćelija sa CK-7 (**A, desno**). Nespecifično vezivanje - NSB (**B, desno**). Razlikuju se definisane strukture sidreće resice - bazalna membrana (bm) i ćelijski stub (ćs) (**A, B**). Vrh strelice označava membransku i/ili intracelularnu lokalizaciju gal-1 (**B, levo**). Veličina podeoka 20 µm.

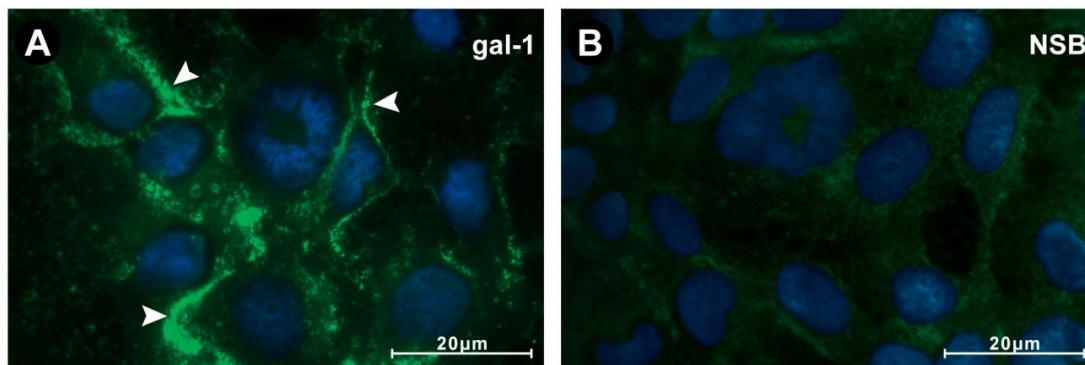
4.1.2. Imunolokalizacija gal-1 u izolovanom CT, imortalizovanoj ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo i horiokarcinomskoj ćelijskoj liniji JAr

Imunocitohemijskom analizom je potvrđeno prisustvo gal-1 u izolovanim citotrofoblastnim ćelijama, HTR-8/SVneo ćelijama, kao i u horiokarcinomskoj JAr ćelijskoj liniji. Fluorescentnim imunocitohemijskim bojenjem je pokazano da izolovani CT i HTR-8/SVneo ćelije ispoljavaju gal-1 kako unutar citoplazme, tako i na samoj površini ćelije (**Slika 16A, B**). Izolovani citotrofoblast je prethodno identifikovan bojenjem na CK-7 (**Slika 16A, desno**). Sve ćelijske linije trofoblastnog porekla su pozitivne na citokeratine, pa su i sve HTR-8/SVneo ćelije bile pozitivne na CK-18 (**Slika 16B, desno**). Nespecifično vezivanje je bilo neznatno ili odsutno. U JAr ćelijama je takođe detektovan gal-1, pri čemu je najintenzivnije bilo perinukleusno bojenje, dok je potpuno izostalo nespecifično vezivanje (**Slika 16C**).



Slika 16. Imunolokalizacija gal-1 u izolovanom CT (A, levo), HTR-8/SVneo (B, levo) i JAr ćelijama (C, levo). Ćelije izolovanog CT su prethodno obojene na CK-7 (A, desno), dok su HTR-8/SVneo ćelije pozitivne na CK-18 (B, desno). Na JAr ćelijama prikazano je i nespecifično vezivanje - NSB (C, desno). Strelica označava intracelularnu, a vrh strelice membransku lokalizaciju gal-1 (A, B, C) Veličina podeoka 20 μm .

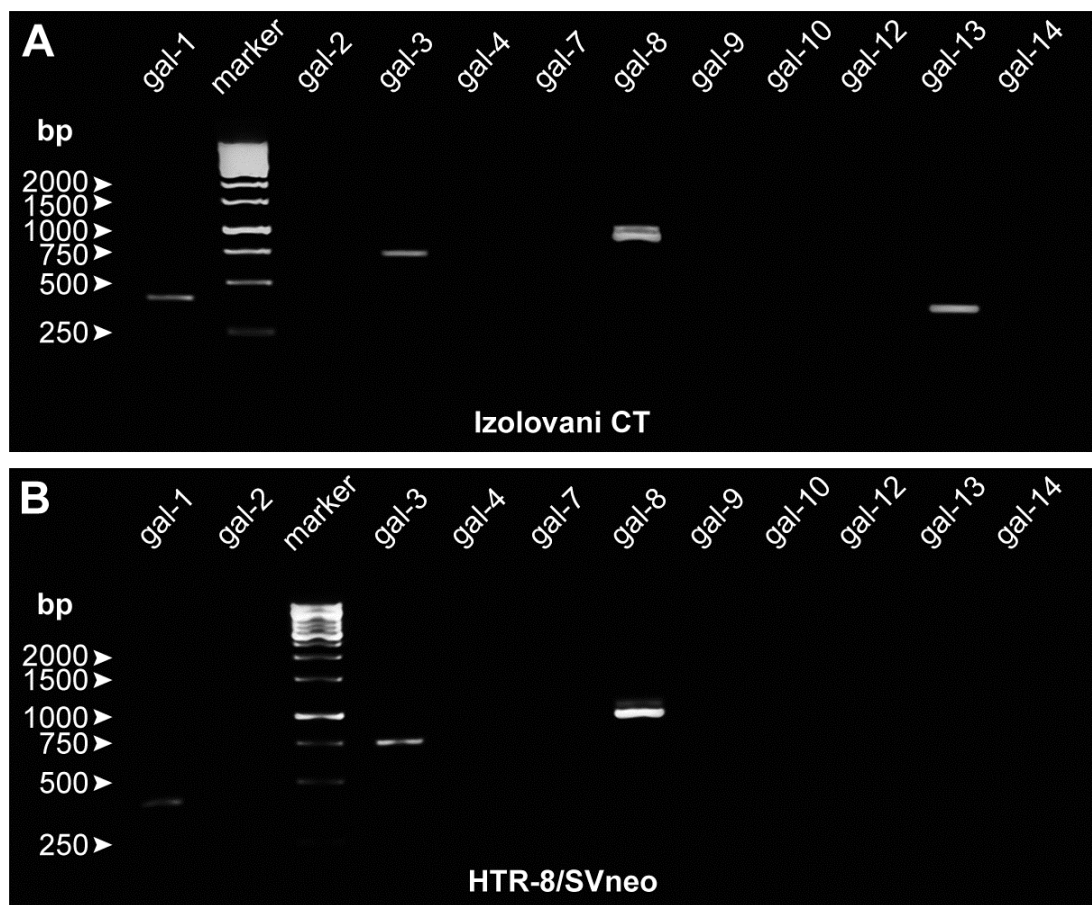
Pored toga, kada su antitela bila prisutna u medijumu tokom 24 h kulture HTR-8/SVneo ćelija, ona su se specifično vezala za ćelijsku membranu (**Slika 17A**), što nije bio slučaj kada su korišćeni neimuni IgG (**Slika 17B**). Ovi rezultati su potvrdili da se antitela prema gal-1 koja blokiraju i njegovu funkciju specifično vezuju za trofoblastne ćelije u kulturi, što ih čini pogodnim za korišćenje u funkcionalnim *in vitro* testovima.



Slika 17. Vezivanje antitela prema gal-1 za membranu HTR-8/SVneo ćelija u kulturi. Vrh strelice označava pozitivno membransko bojenje (**A**). Nespecifično vezivanje - NSB (**B**). Veličina podeoka 20 µm.

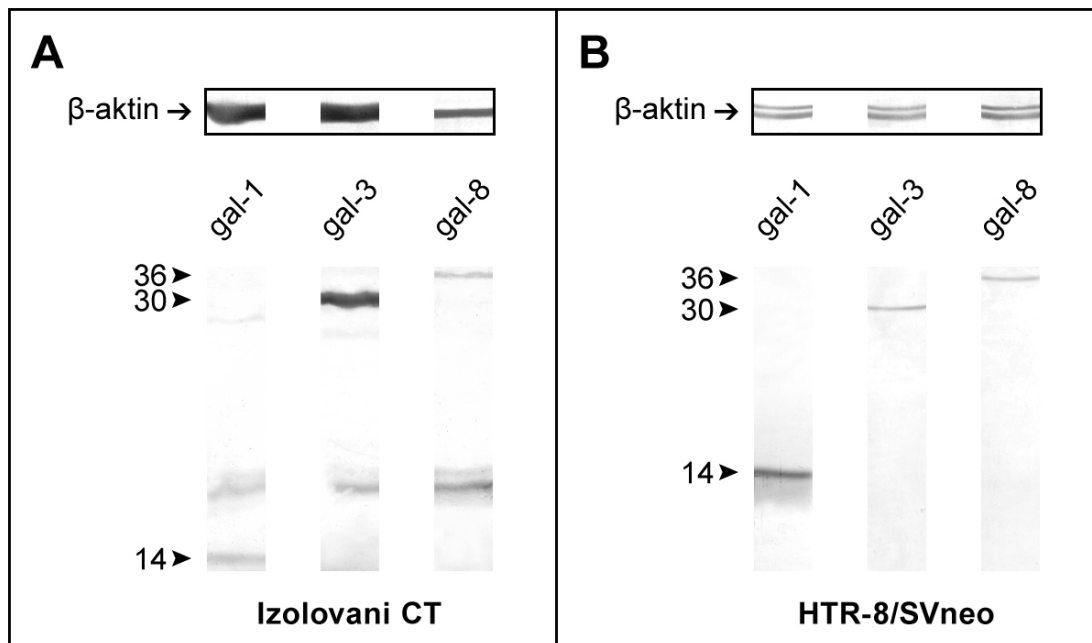
4.1.3. Ekspresija galektina na nivou RNK i proteina u EVT *in vitro*

Korišćenjem odgovarajućih prajmera za gal-1, -2, -3, -4, -7, -8, -9, -10, -12, -13 i -14, RT-PCR analizom je ispitana ekspresija ovih 11 galektina u izolovanom CT i HTR-8/SVneo ćelijama. Pokazana je ekspresija gal-1, -3 i -8 na nivou RNK u oba tipa ispitivanih trofoblastnih ćelija (**Slika 18A, B**), dok se transkript za gal-13 povremeno detektuje samo u lizatima izolovanog CT (**Slika 18A**). Ova nekonzistentna detekcija RNK za gal-13 u izolovanom CT predstavlja rezultat kontaminacije izolata ovih ćelija fragmentima sinciotrofoblasta.



Slika 18. Ekspresija galektina na nivou RNK u izolovanom CT (A) i HTR-8/SVneo ćelijama (B). RT-PCR analiza pokazuje prisustvo transkripata za gal-1, -3 i -8 u oba ispitivana tipa trofoblastnih ćelija. Povremena detekcija transkripta za gal-13 u izolovanom citotrofoblastu (A) je rezultat kontaminacije izolata ovih ćelija fragmentima sinciotrofoblasta. Standardi su označeni vrhom strelica.

Ova tri galektina su detektovana i na proteinskom nivou u izolovanom CT i HTR-8/SVneo ćelijama Western blot analizom. U oba ispitivana ćelijska tipa su detektovane specifične trake bile očekivanih molekulskih masa. Tako se uočavaju traka od 14 kDa koja odgovara gal-1, traka od 30 kDa koja odgovara gal-3 i traka od 36 kDa koja odgovara gal-8 (Slika 19A, B). Analizom galektinskog profila invazivnog trofoblasta je po prvi put pokazana ekspresija gal-8 na nivou RNK i proteina u trofoblastnim ćelijama *in vitro*.

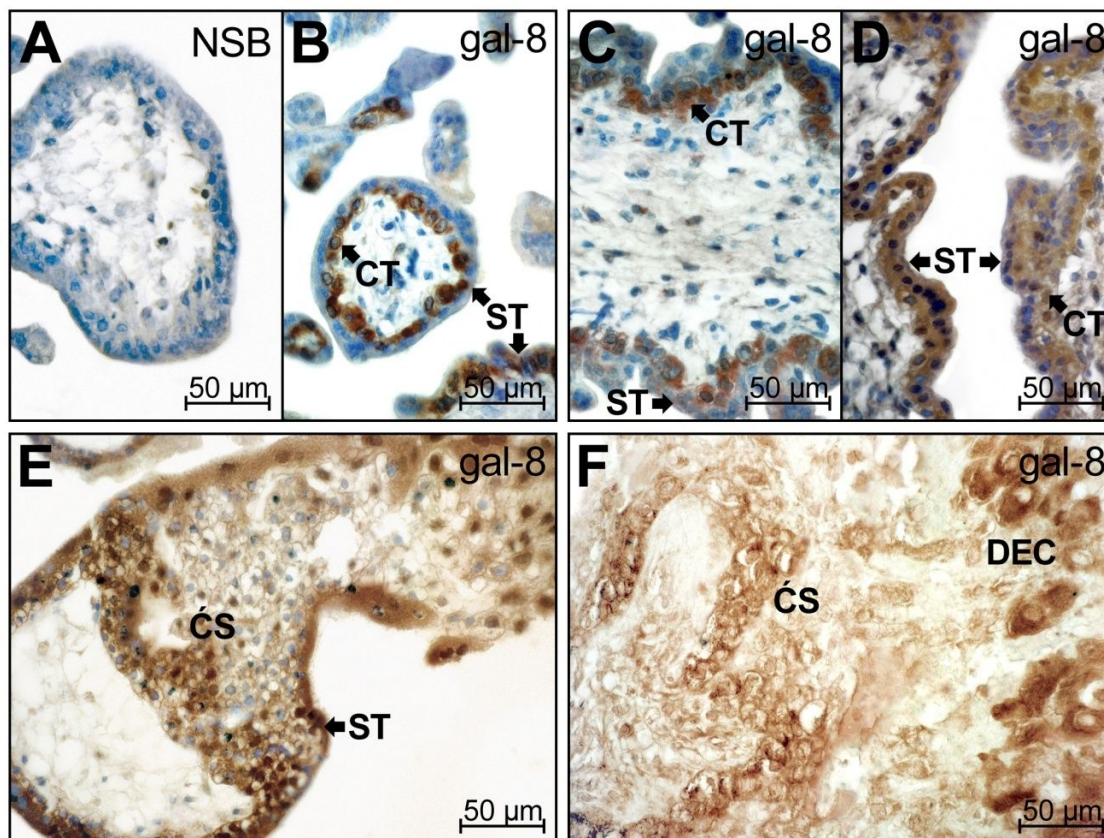


Slika 19. Ekspresija galektina u lizatima izolovanog CT (A) i HTR-8/SVneo ćelija (B) detektovana Western blot-om. Proteinske trake odgovarajućih molekularnih masa u kDa za gal-1, -3 i -8 su označene vrhom strelica. Odgovarajuće trake za β -aktin predstavljaju „loading” kontrolu.

4.1.4. Imunolokalizacija gal-8 u tkivu normalne placente prvog trimestra

Kako je RT-PCR i Western blot analizom pokazano da trofoblast eksprimira gal-8, bilo je potrebno utvrditi i njegovu lokalizaciju u tkivu placente i trofoblastnim ćelijama imunohistohemijskim bojenjem parafinskih isečaka tkiva normalnih placenti prvog trimestra (n=10). Pokazan je visok nivo ekspresije gal-8 u vilusnom citotrofoblastu (**Slika 20B-D**), dok je bojenje sinciotrofoblasta na gal-8 bilo difuzno, i bleđe nego bojenje vilusnog citotrofoblasta, a takođe je uočena varijabilnost kako od preparata do preparata (**Slika 20B-D**), tako i između različitih resica istog preparata (**Slika 20B, C**), od negativnog do jako pozitivnog. Ćelije citotrofoblasta ćelijskog stuba su takođe bile pozitivne na gal-8, mada intenzivnije obojene u njegovom proksimalnom delu (**Slika 20E**). Slična

imunolokalizacija gal-8 je pokazana u sidrećim resicama koje su ukotvljene u deciduu, gde se može uočiti i intenzivno bojenje decidualnih stromalnih ćelija na gal-8 (Slika 20F). Intersticijalni trofoblast je bio bledo obojen (Slika 20F).



Slika 20. Imunolokalizacija gal-8 u plivajućim resicama (B-D), ćelijskim stubovima i sidrećim resicama normalne placente prvog trimestra (E, F). Nespecifično vezivanje - NSB (A). Vilusni citotrofoblast (CT) plivajućih resica je intenzivno obojen na gal-8, dok je bojenje sinciotrofoblasta (ST) varijabilno (B-D). B i C predstavljaju bojenja resica iste placente, pa tako razlikujemo centralnu resicu (B) gde je ST potpuno neobojen, a ST druge dve resice je umereno pozitivan na gal-8 (desni donji ugao B, C). Plivajuće resice različitih placenti su umereno do intenzivno obojene na gal-8 (D). U sidrećim resicama najintenzivnije bojenje na gal-8 je u proksimalnom delu ćelijskog stuba (ĆS) (F). Distalno, ka stromi decidue intenzitet bojenja slabi, tako da je intersticijalni trofoblast bledo obojen, dok su decidualne stromalne ćelije (DEC) jako obojene (F). Veličina podeoka 50 µm.

Rezultati dobijeni imunohistochemijskom analizom parafinskih isečaka tkiva normalnih placenti prvog trimestra upotrebom anti-gal-8 antitela prikazani su u **Tabeli II**.

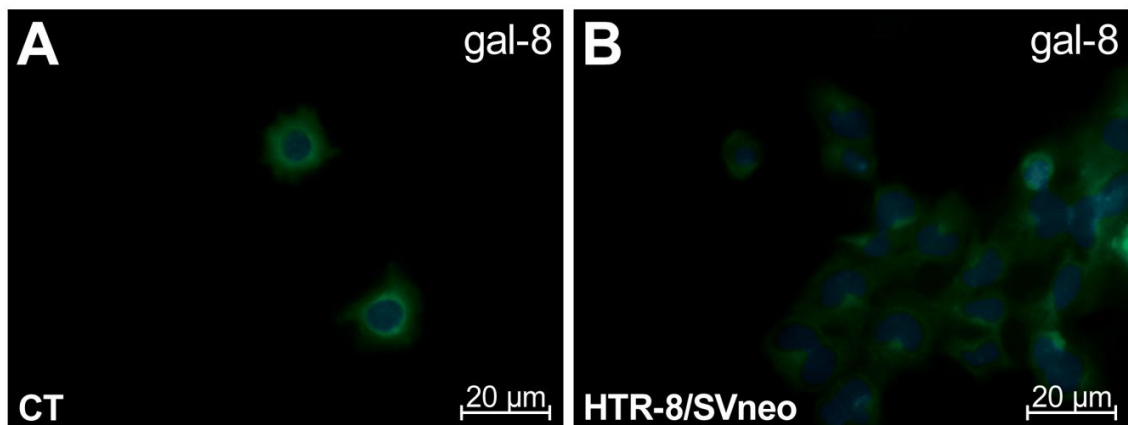
Tabela II. Ekspresija gal-8 u normalnom tkivu placente prvog trimestra.

Ćelijski tip	Intenzitet bojenja
Vilusni citotrofoblast	++/+++
Vilusni sinciotrofoblast	-/+; ++
EVT ćelijskog stuba	++/+++
EVT ćelijskog ostrvca	+/>++
Intersticijalni trofoblast	-/+
Endovaskularni trofoblast	-/+
Decidualna stromalna ćelija	+/>+++; +++
Decidualna žlezda	+/>++

Intenzitet bojenja: - negativno; -/+ negativno do slabo pozitivno; + slabo pozitivno; ++ pozitivno i +++ intenzivno bojenje.

4.1.5. Imunolokalizacija gal-8 u izolovanom CT i ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo

Imunocitochemijskom analizom je potvrđeno prisustvo gal-8 u izolovanom CT i HTR-8/SVneo ćelijama. Fluorescentno imunocitochemijsko bojenje na gal-8 je bilo isključivo citoplazmatsko za oba tipa trofoblastnih ćelija u kulturi (**Slika 21A, B**). Nespecifično vezivanje je bilo neznatno ili odsutno.



Slika 21. Imunolokalizacija gal-8 u izolovanom CT (A) i HTR-8/SVneo ćelijama (B). Bojenje je isključivo citoplazmatsko. Veličina podeoka 20 µm.

4.2. Značaj lektinskog tipa interakcija za ćelijsku adheziju i migraciju trofoblasta *in vitro*

Adhezija, migracija i invazija ćelija trofoblasta predstavljaju procese od ključnog značaja za uspešno uspostavljanje i odvijanje trudnoće. Duž invazivnog puta diferencijacije, EVT stupa u niz interakcija sa glikoproteinima vanćelijskog matriksa (trofoblastnog i decidualnog porekla), od kojih su neki poznati fiziološki ligandi za gal-1 (npr. LN i onfFN) [224] i za koje se gal-1 vezuje zavisno od koncentracije [177]. Zbog toga je bilo značajno utvrditi u kojoj meri gal-1 trofoblastnog porekla učestvuje u procesima ćelijske adhezije, migracije i invazije. U ranijim istraživanjima naše laboratorije pokazan je značajan uticaj laktoze, inhibitornog šećera za lektinski tip interakcija galektina na invazivnost HTR-8/SVneo ćelija *in vitro*, u smislu smanjene invazije ovih ćelija [213]. Kako bi se ispitaio značaj lektinskog tipa interakcija za ćelijsku adheziju i migraciju trofoblasta *in vitro* izvedeni su testovi adhezije i migracije na modelima invazivnog trofoblasta - ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo i horiokarcinomskoj ćelijskoj liniji JAr. U ovim *in vitro* testovima su kao tretmani korišćeni šećeri koji ulaze u

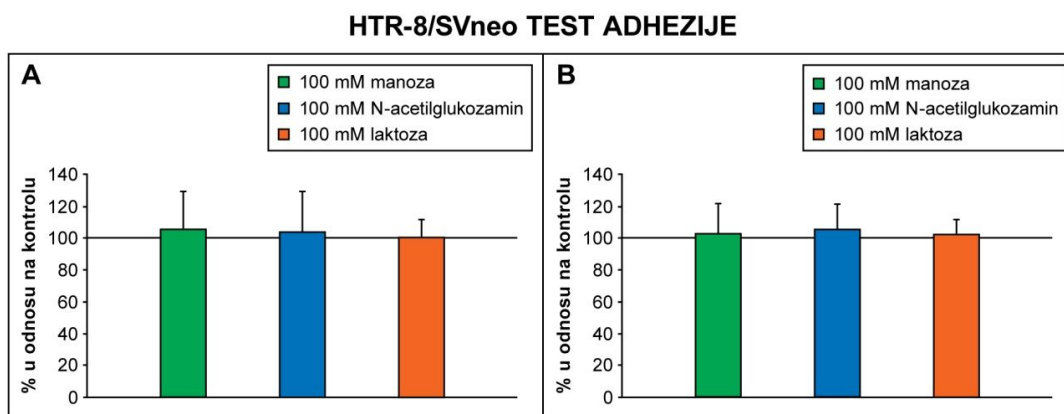
sastav različitih N-glikana: monosaharidi manozna i N-acetil-glukozamin, kao i inhibitorni disaharid za galektine - laktoza.

4.2.1. Uticaj šećera na adheziju trofoblasta

Ispitivan je mogući uticaj manoze, N-acetil-glukozamina i laktoze na adheziju HTR-8/SVneo i JAr ćelija *in vitro*.

4.2.1.1. Uticaj šećera na adheziju HTR-8/SVneo ćelija

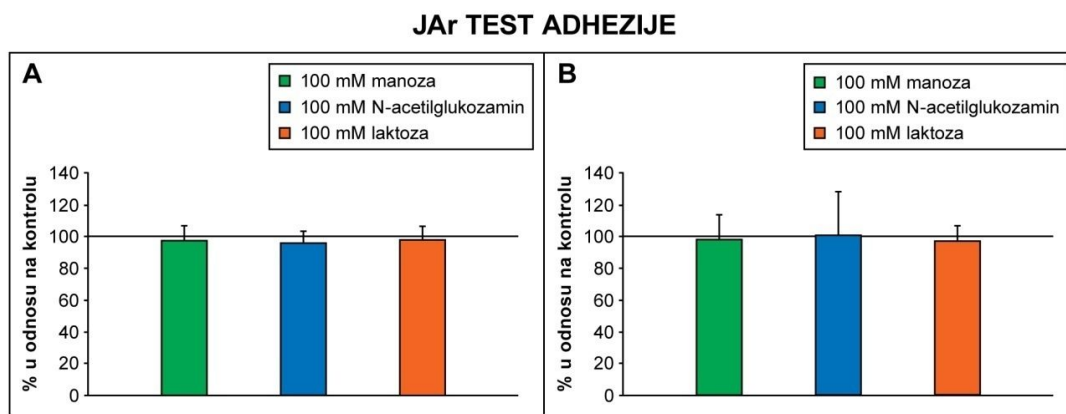
U ovom testu praćena je adhezija na površinu obloženu Matrigelom u tankom sloju. HTR-8/SVneo ćelije su inkubirane u potpunom tj. osnovnom medijumu bez (kontrola) ili sa 100 mM manozom, 100 mM N-acetil-glukozaminom i 100 mM laktozom. Dobijeni rezultati su pokazali da rastvori šećera koje smo koristili u ovom ispitivanju nisu imali znaćajan uticaj na adheziju HTR-8/SVneo u odnosu na kontrolu (Slika 22A, B).



Slika 22. Uticaj 100 mM manoze, 100 mM N-acetil-glukozamina i 100 mM laktoze u osnovnom (A) ili potpunom RPMI 1640 medijumu (B) na adheziju HTR-8/SVneo ćelija za Matrigel. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost apsorbance na 620 nm \pm SEM (standardna greška) i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu; n=18.

4.2.1.2. Uticaj šećera na adheziju JAr ćelija

JAr ćelije su takođe inkubirane u kompletnom ili osnovnom medijumu bez (kontrola) ili sa manozom, N-acetil-glukozaminom i laktozom i ispitivan je uticaj navedenih šećera na adheziju ovih ćelija za Matrigel. Kao i u slučaju HTR-8/SVneo ćelija, 100 mM manozu, 100 mM N-acetil-glukozamin i 100 mM laktazu, kako u osnovnom, tako i u kompletnom medijumu nisu imali značajan uticaj na adheziju JAr ćelija u odnosu na kontrolu (Slika 23A, B).



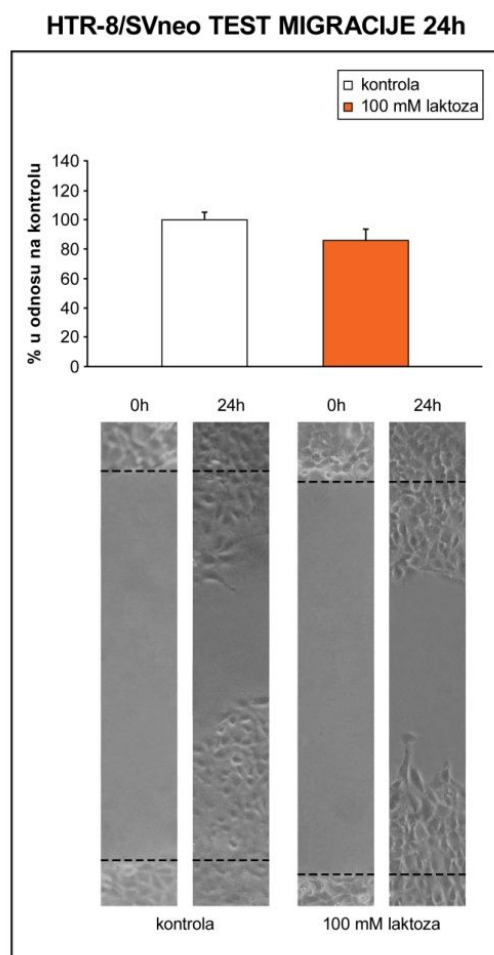
Slika 23. Uticaj 100 mM manoze, 100 mM N-acetil-glukozamina i 100 mM laktaze u osnovnom (A) ili kompletnom DMEM/F12 medijumu (B) na adheziju JAr ćelija za Matrigel. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost apsorbance na 620 nm \pm SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu; n=18.

4.2.2. Uticaj šećera na migraciju trofoblasta

Mogućnost da ispitivani šećeri utiču na migratorna svojstva HTR-8/SVneo i JAr ćelija, ispitana je korišćenjem *in vitro* testova migracije u prisustvu šećera.

4.2.2.1. Uticaj laktoze na migraciju HTR-8/SVneo ćelija

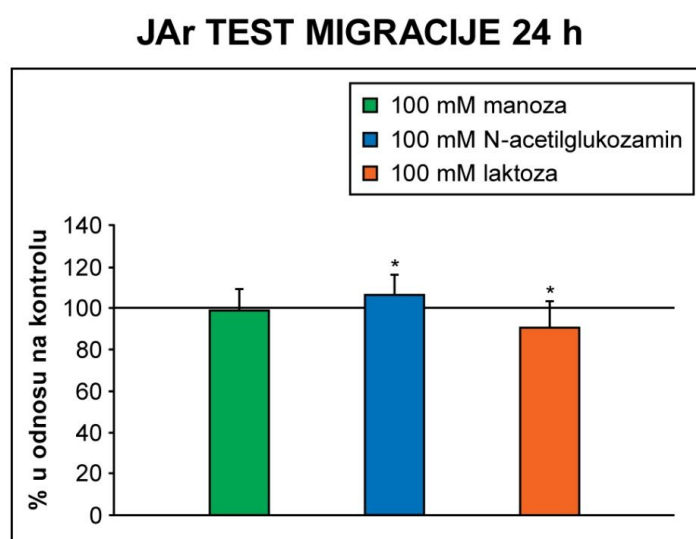
Mogući uticaj laktoze na migraciju HTR-8/SVneo ćelija ispitivali smo u tzv. „wound healing“ testu migracije. U eksperimentu je poređen pređeni put ćelija trofoblasta posle ozleđivanja monolejera u prisustvu 100 mM laktoze sa onim u kontrolnom medijumu bez dodatka laktoze. Dobijeni rezultati su pokazali izvestan inhibitorni efekat laktoze (86% u odnosu na kontrolu) na migraciju HTR-8/SVneo ćelija, koji nije bio statistički značajan (Slika 24).



Slika 24. Uticaj 100 mM laktoze na migraciju HTR-8/SVneo ćelija. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost pređenog puta \pm SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu; n=9.

4.2.2.2. Uticaj šećera na migraciju JAr ćelija

Ispitivan je i mogući uticaj 100 mM manoze, 100 mM N-acetil-glukozamina i 100 mM laktoze na migratornu sposobnost JAr ćelija u „transwell” testu migracije. Nakon 24 h inkubacije, prisustvo N-acetilglukozamina u medijumu je blago, ali značajno stimulisalo (106% u odnosu na kontrolu, gde je $p < 0,05$) migraciju JAr ćelija, dok je laktoza imala suprotno dejstvo (92% u odnosu na kontrolu, gde je $p < 0,05$) (Slika 25).



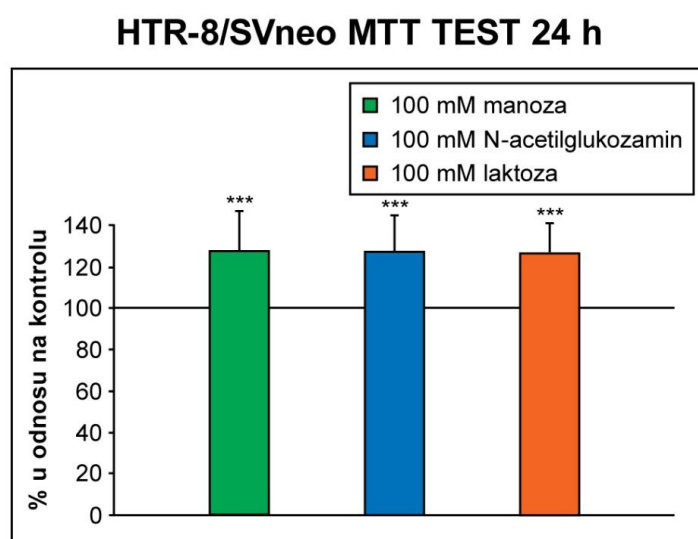
Slika 25. Uticaj 100 mM manoze, 100 mM N-acetil-glukozamina i 100 mM laktoze na migraciju JAr ćelija. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost apsorbance na 540 nm \pm SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu; $n=12$. Statistički značajna razlika između kontrole i tretmana za $p < 0,05$ označena je sa *.

4.3. Uticaj šećera na vijabilnost trofoblasta *in vitro*

Da bi se potpunije sagledali efekti ispitivanih šećera, u prvom redu laktoze na funkcionalna svojstva trofoblastnih ćelija *in vitro*, ispitivali smo njihov mogući uticaj na preživljavanje HTR-8/SVneo i JAr ćelija MTT testom.

4.3.1. Uticaj šećera na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija

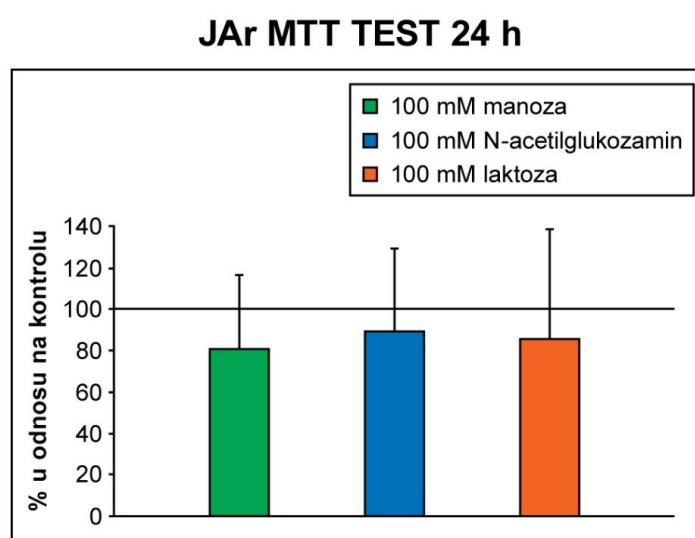
HTR-8/SVneo ćelije su inkubirane u osnovnom medijumu koji je sadržao 0,1% BSA bez (kontrola) ili sa manozom, N-acetil-glukozaminom i laktozom i kvantifikovan je broj metabolički aktivnih ćelija. Dobijeni rezultati MTT testa pokazuju da 100 mM rastvori ispitivanih šećera nakon 24 h podjednako povećavaju broj vijabilnih HTR-8/SVneo ćelija (u proseku oko 130% u odnosu na kontrolu, gde je $p < 0,001$) (Slika 26).



Slika 26. Uticaj 100 mM manoze, 100 mM N-acetil-glukozamina i 100 mM laktoze na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost broja ćelija \pm SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu; $n=18$. Statistički značajna razlika između kontrole i tretmana za $p < 0,001$ označena je sa ***.

4.3.2. Uticaj šećera na vijabilnost JAr ćelija

Ispitali smo i mogući uticaj ova tri šećera na preživljavanje JAr ćelija. Dobijeni rezultati su pokazali da ni jedan od ispitivanih šećera ne menja značajno broj vijabilnih JAr ćelija u odnosu na kontrolu (Slika 27).



Slika 27. Uticaj 100 mM manoze, 100 mM N-acetil-glukozamina i 100 mM laktoze na vijabilnost JAr ćelija. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost broja ćelija \pm SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu; n=18.

4.4. Uticaj endogenog gal-1 na ćelijsku adheziju i migraciju trofoblasta *in vitro*

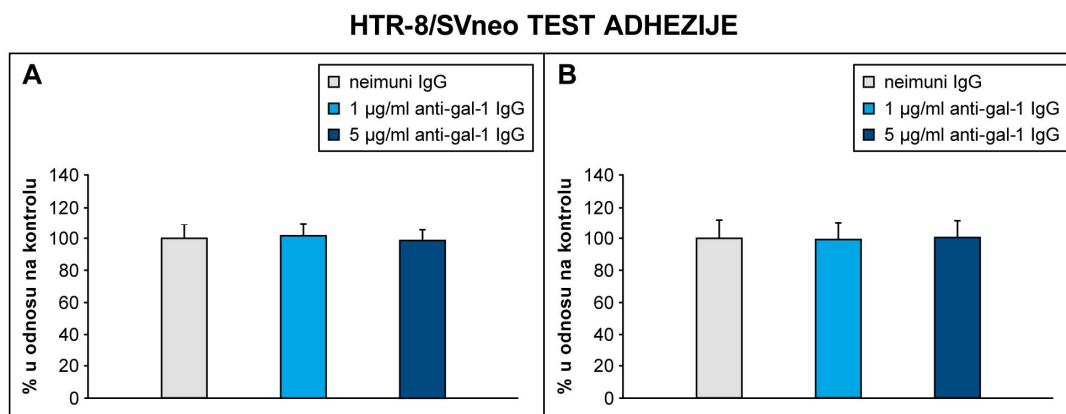
Jedan od glavnih ciljeva ovog rada bio je ispitivanje mogućeg uticaja endogenog gal-1 na adheziju trofoblastnih ćelija korišćenjem antitela prema gal-1 koja blokiraju i njegovu funkciju. Pored toga, pomoću ovih antitela ispitivan je i mogući uticaj endogenog gal-1 na migraciju ćelija trofoblasta *in vitro*.

4.4.1. Uticaj endogenog gal-1 na adheziju trofoblasta

Mogući uticaj endogenog gal-1 na adhezivna svojstva HTR-8/SVneo i JAr ćelija ispitivan je u *in vitro* testu adhezije na Matrigelu.

4.4.1.1. Uticaj endogenog gal-1 na adheziju HTR-8/SVneo ćelija

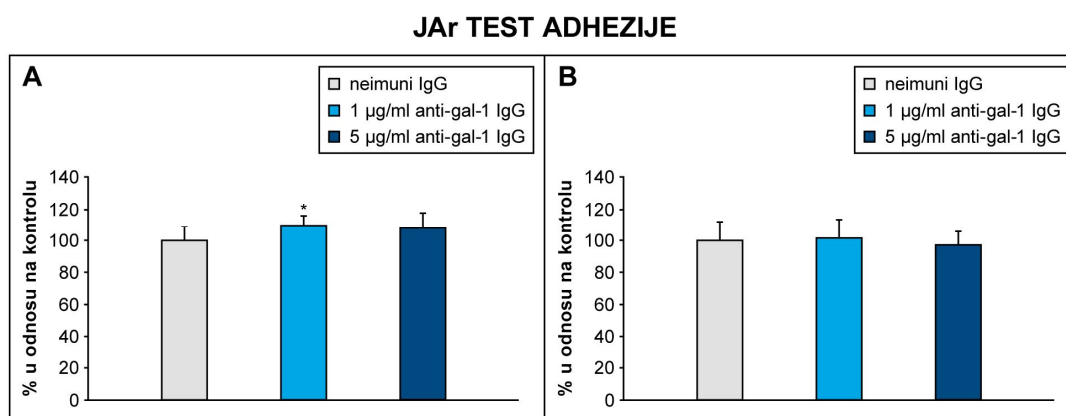
U testu adhezije, HTR-8/SVneo ćelije su inkubirane u potpunom ili osnovnom medijumu (bez FCS) sa neimunim IgG (kontrola) ili sa anti-gal-1 antitelima (1 i 5 µg/ml) na površini prethodno obloženoj tankim slojem Matrigela. Pokazano je da anti-gal-1 antitela ni u jednoj ispitivanoj koncentraciji, kako u osnovnom, tako i u potpunom medijumu nisu imala značajan uticaj na adheziju HTR-8/SVneo za Matrigel u odnosu na kontrolu (Slika 28A, B). Rezultati naše grupe su međutim pokazali korišćenjem drugačijeg pristupa, tj. vremena inkubacije i broja ćelija da endogeni gal-1 ima značaja za adheziju HTR-8/SVneo ćelija za plastiku, kolagen tipa I i fibronektin [238].



Slika 28. Uticaj anti-gal-1 antitela (1 i 5 µg/ml) u osnovnom (A) ili potpunom RPMI 1640 medijumu (B) na adheziju HTR-8/SVneo ćelija za Matrigel. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost apsorbance na 620 nm ± SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu; n=18.

4.4.1.2. Uticaj endogenog gal-1 na adheziju JAr ćelija

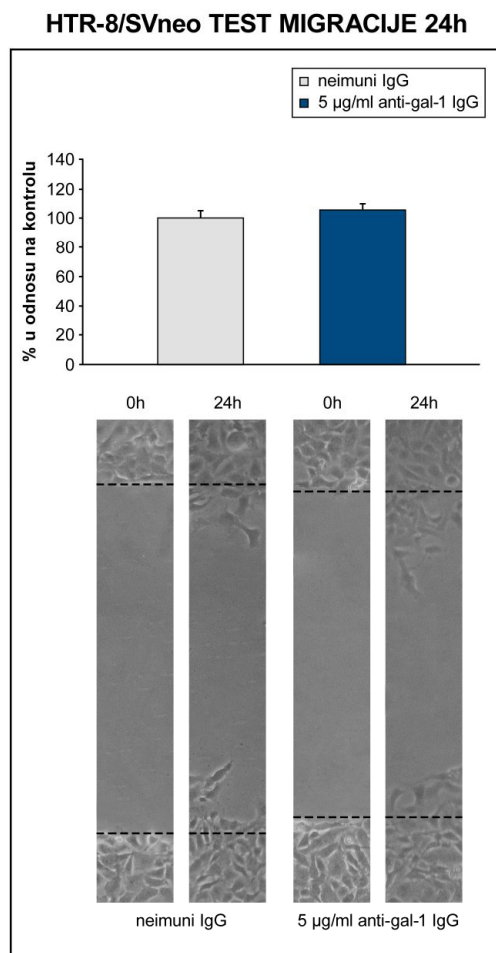
Ispitivanje mogućeg uticaja endogenog gal-1 na adheziju JAr ćelija na površinu prethodno obloženu tankim slojem Matrigela je vršeno na način opisan za HTR-8/SVneo ćelije. Dobijeni rezultati pokazuju da su obe ispitivane koncentracije anti-gal-1 antitela (1 i 5 $\mu\text{g/ml}$) u osnovnom medijumu imale blagi stimulatorni uticaj na adheziju JAr ćelija za Matrigel, pri čemu je efekat niže koncentracije ovih antitela bio statistički značajan (109% u odnosu na kontrolu, gde je $p < 0,05$) (Slika 29A). Sa druge strane, efekat obe koncentracije anti-gal-1 antitela u kompletnom medijumu nije bio značajan za adheziju JAr ćelija za Matrigel u odnosu na kontrolu (Slika 29B).



Slika 29. Uticaj anti-gal-1 antitela (1 i 5 $\mu\text{g/ml}$) u osnovnom (A) ili kompletnom DMEM/F12 medijumu (B) na adheziju JAr ćelija za Matrigel. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost apsorbance na 620 nm \pm SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu; n=18. * označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana za $p < 0,05$.

4.4.2. Uticaj endogenog gal-1 na migraciju HTR-8/SVneo ćelija

U prethodnom nizu eksperimenata pokazano je da laktoza u izvesnoj meri inhibira migraciju HTR-8/SVneo ćelija nakon 24 h inkubacije u kulturi, ali ovaj efekat nije bio statistički značajan. Pored toga, ispitan je i mogući uticaj endogenog gal-1 na migratornu sposobnost HTR-8/SVneo ćelija korišćenjem anti-gal-1 antitela u koncentraciji od 5 $\mu\text{g/ml}$. Dobijeni rezultati su pokazali blagi stimulatorni efekat anti-gal-1 antitela (106% u odnosu na kontrolu) na migraciju HTR-8/SVneo ćelija, koji nije bio statistički značajan (**Slika 30**).



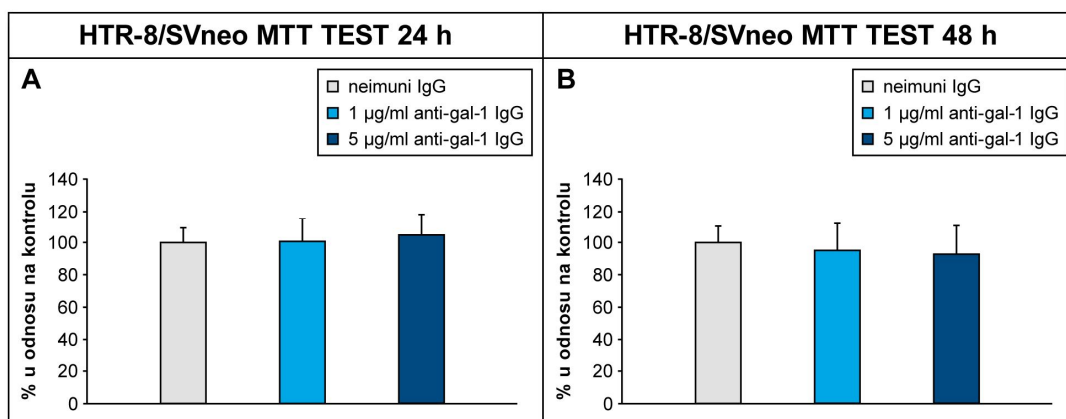
Slika 30. Uticaj anti-gal-1 (5 $\mu\text{g/ml}$) na migraciju HTR-8/SVneo ćelija. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost pređenog puta \pm SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu; n=9.

4.5. Uticaj gal-1 na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija *in vitro*

Invazivni ekstravilusni trofoblast ne proliferiše *in vivo*, kao ni izolovane citotrofoblastne ćelije u kulturi. Pošto je pokazano da pojedini galektini utiču na ćelijsku proliferaciju u različitim model sistemima [239-241], ispitivan je mogući uticaj endogenog i egzogenog gal-1 na vijabilnost, odnosno preživljavanje HTR-8/SVneo ćelija pomoću MTT testa, kao mogućeg indikatora uticaja na proliferaciju.

4.5.1. Uticaj endogenog gal-1 na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija

Za MTT test, HTR-8/SVneo ćelije su prethodno inkubirane 24 ili 48 h u osnovnom medijumu koji sadrži 0,1% BSA sa neimunim IgG (kontrola) ili sa anti-gal-1 antitelima (1 i 5 µg/ml), a zatim je određivana metabolička aktivnost ćelija. Dobijeni rezultati su pokazali da nakon 24 h, kao i nakon 48 h obe ispitivane koncentracije anti-gal-1 antitela ne utiču na vijabilnost i proliferaciju HTR-8/SVneo ćelija (**Slika 31A, B**). Dobijeni rezultati ukazuju da blokiranje funkcije endogenog gal-1 sa ekstracelularnom lokalizacijom nema direktnog uticaja na proliferaciju ćelija.

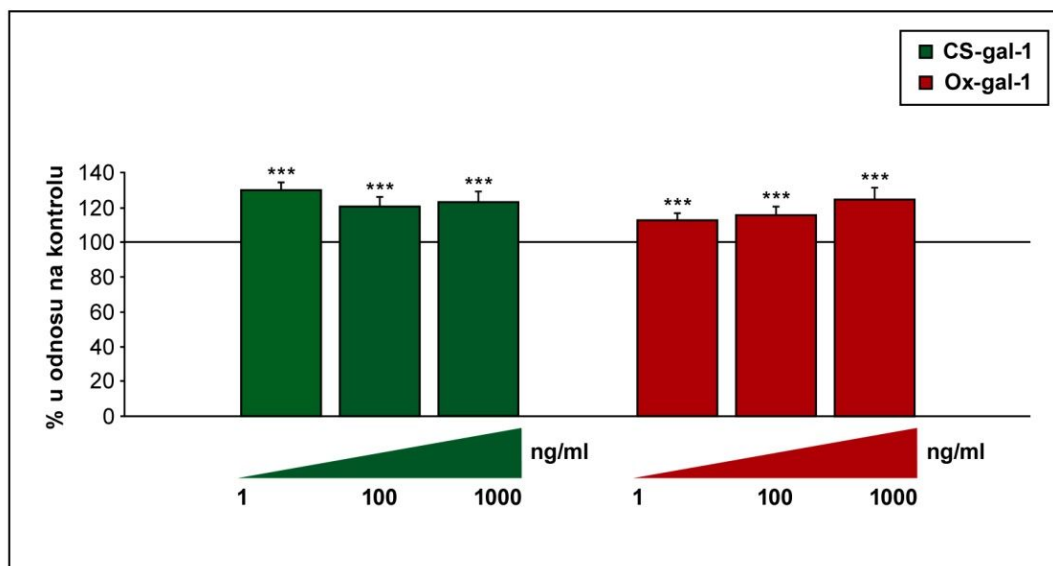


Slika 31. Uticaj anti-gal-1 antitela (1 i 5 µg/ml) nakon 24 h (A) i 48 h inkubacije (B) na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost broja ćelija ± SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu; n=18.

4.5.2. Uticaj egzogenog gal-1 na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija

Mogućnost da povećana dostupnost ekstracelularnog gal-1 modulira preživljavanje HTR-8/SVneo ćelija ispitivana je korišćenjem različitih koncentracija (1, 100 i 1000 ng/ml) dveju molekularnih formi rHgal-1, od kojih jedna poseduje lektinsku aktivnost (CS-gal-1), a druga ne (Ox-gal-1). Pokazano je da nakon 24 h obe molekulske forme rHgal-1 u svim ispitivanim koncentracijama značajno povećavaju broj ili metaboličku aktivnost HTR-8/SVneo ćelija ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolu (**Slika 32**). Stimulatorni efekat CS-gal-1 na preživljavanje HTR-8/SVneo ćelija je bio maksimalan pri koncentraciji od 1 ng/ml (132% u odnosu na kontrolu), i nije se dalje povećavao korišćenjem viših koncentracija ovog proteina (100 i 1000 ng/ml). Sa druge strane, stimulatorni efekat Ox-gal-1 na preživljavanje HTR-8/SVneo ćelija bio je dozno zavisna, sa maksimalnom stimulacijom pri koncentraciji od 1000 ng/ml (127% u odnosu na kontrolu).

HTR-8/SVneo MTT TEST 24 h



Slika 32. Uticaj različitih koncentracija (1, 100 i 1000 ng/ml) CS-gal-1 i Ox-gal-1 na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost broja ćelija \pm SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu; n=18. *** označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana za $p < 0,001$.

Dodatna istraživanja naše grupe su međutim pokazala, praćenjem markera proliferacije i apoptoze, da ispitivani tretmani ne dovode do značajnih promena u broju proliferišućih, niti ćelija u apoptozi [238], što ukazuje da opisani tretmani utiču na povećanje aktivnosti mitohondrijalnih enzima.

4.6. Biološki značaj gal-1 za invazivna svojstva EVT *in vitro*

Galektin-1 se različito eksprimira u EVT duž invazivnog puta diferencijacije ovih ćelija [206-210]. Pored toga, decidualne stromalne ćelije, sa kojima intersticijalni EVT može stupiti u interakciju *in vivo*, takođe ekspimiraju gal-1 [170]. Kao što je već navedeno, u prethodnim istraživanjima naše laboratorije pokazan je značajan inhibitorski

uticaj laktoze na invaziju HTR-8/SVneo ćelija *in vitro* [213], što implicira značaj lektinskih interakcija za invazivna svojstva trofoblasta. U oblasti biologije tumora postoje brojni podaci o uticaju gal-1 na invazivnost ćelija [186, 242, 243]. Međutim, nije postojao nijedan direktan podatak o učešću gal-1 u invaziji trofoblasta. Stoga je bilo potrebno ispitati da li je gal-1 relevantan za proces trofoblastne invazije. Ovo ispitivanje je bilo zasnovano na *in vitro* testu invazije Matrigela sa citotrofoblastnim ćelijama izolovanim iz placenti prvog trimestra normalne trudnoće, ili HTR-8/SVneo ćelijama. Mogući uticaj endogenog gal-1 na invaziju trofoblastnih ćelija *in vitro* ispitivali smo korišćenjem anti-gal-1 antitela koja blokiraju funkciju gal-1, dok je mogući uticaj egzogenog gal-1 na ovaj proces ispitivan upotrebom dve molekulske forme rhgal-1 (CS-gal-1 i Ox-gal-1).

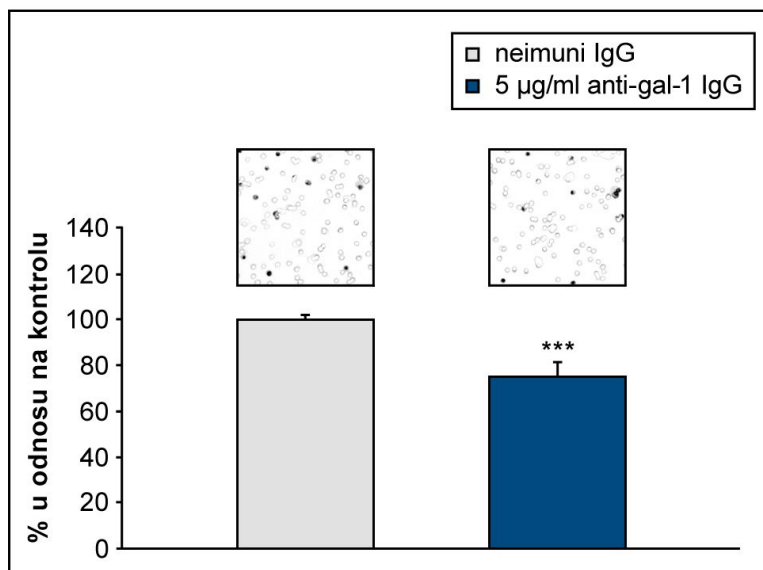
4.6.1. Uticaj endogenog gal-1 sa ekstracelularnom lokalizacijom na invaziju trofoblasta

Ispitivan je mogući uticaj endogenog gal-1 na invazivnost izolovanog CT i HTR-8/SVneo ćelija korišćenjem anti-gal-1 antitela u *in vitro* testu invazije Matrigela.

4.6.1.1. Uticaj endogenog gal-1 na invaziju izolovanog CT

U testu invazije, izolovane citotrofoblastne ćelije su inkubirane u osnovnom medijumu koji je sadržao 0,1% BSA sa neimunim IgG (kontrola) ili sa anti-gal-1 antitelima u koncentraciji od 5 µg/ml. Dobijeni rezultati su pokazali da prisustvo anti-gal-1 antitela u medijumu značajno smanjuje invaziju (75% u odnosu na kontrolu, gde je $p < 0,001$) izolovanog CT (**Slika 33**). Dobijeni rezultati ukazuju na značaj endogenog gal-1 za invazivnost trofoblastnih ćelija u *in vitro* uslovima.

Izolovani CT TEST INVAZIJE 24 h

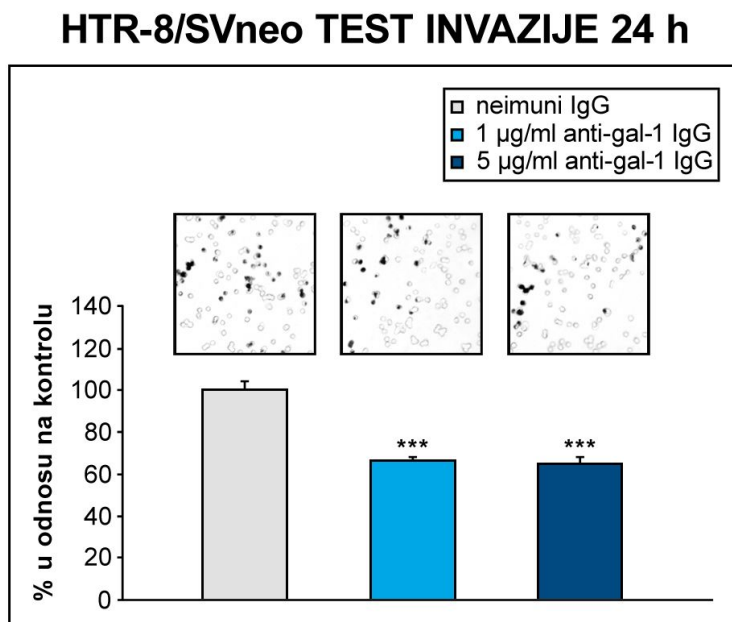


Slika 33. Uticaj anti-gal-1 (5 µg/ml) na invaziju izolovanog CT. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost broja zauzetih pora ± SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu. Reprezentativne slike obojenih membrana sa zauzetim porama predstavljene su kvadratima iznad odgovarajućih stubića. Citotrofoblastne ćelije korišćene u ovom eksperimentu izolovane su iz devet placenti prvog trimestra normalne trudnoće. Statistički značajna razlika između kontrole i tretmana za $p < 0,001$ označena je sa ***.

4.6.1.2. Uticaj endogenog gal-1 na invaziju HTR-8/SVneo ćelija

Ispitali smo i mogući uticaj anti-gal-1 antitela (1 i 5 µg/ml) na invaziju HTR-8/SVneo ćelija. Dobijeni rezultati su pokazali da nakon 24 h obe ispitivane koncentracije anti-gal-1 antitela podjednako smanjuju invaziju HTR-8/SVneo ćelija (u proseku na 65% od kontrole, gde je $p < 0,001$) (**Slika 34**). U testu invazije sa izolovanim CT i HTR-8/SVneo ćelijama pokazan je uporediv efekat anti-gal-1 antitela na invazivnost ovih ćelija, što potvrđuje pretpostavku značaja endogenog gal-1 za invazivna svojstva trofoblasta *in vitro*.

Sličnost rezultata dobijenih na oba ćelijska tipa dodatno potvrđuje da je HTR-8/SVneo ćelijska linija pogodan model invazivnog trofoblasta rane trudnoće.



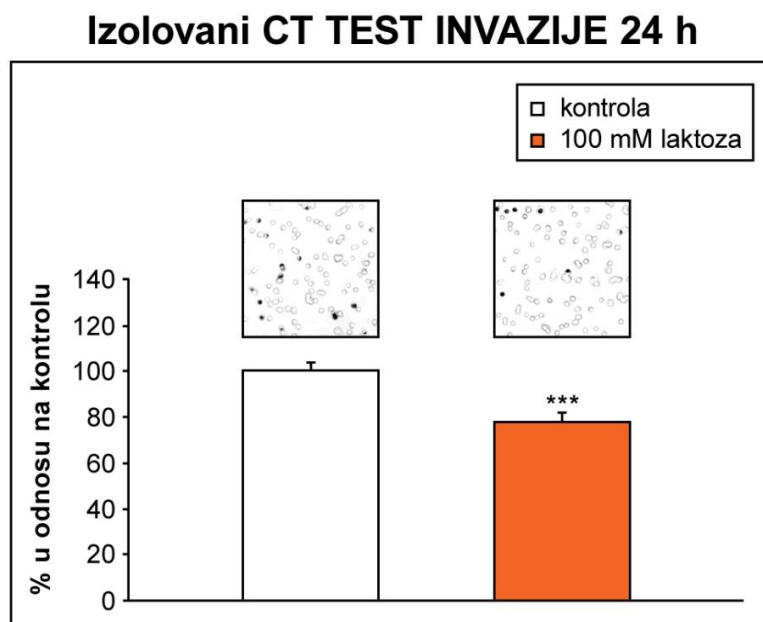
Slika 34. Uticaj anti-gal-1 antitela (1 i 5 µg/ml) na invaziju HTR-8/SVneo ćelija. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost broja zauzetih pora ± SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu; $n \geq 8$. Reprezentativne slike obojenih membrana sa zauzetim porama predstavljene su kvadratima iznad odgovarajućih stubića. Statistički značajna razlika između kontrole i tretmana za $p < 0,001$ označena je sa ***.

4.6.2. Značaj lektinskog tipa interakcija za invaziju trofoblasta

U nastojanju da se ispita značaj lektinskog tipa interakcija za invazivna svojstva trofoblasta *in vitro*, korišćen je test invazije Matrigela sa izolovanim citotrofoblastnim ćelijama u prisustvu laktoze, inhibitornog šećera za galektine.

4.6.2.1. Uticaj laktoze na invaziju izolovanog CT

Izolovane citotrofoblastne ćelije su inkubirane u osnovnom medijumu koji je sadržao 0,1% BSA bez (kontrola) ili sa 100 mM laktozom. Pokazano je da 100 mM laktoza značajno inhibira invaziju izolovanog CT (78% u odnosu na kontrolu, gde je $p < 0,001$) (Slika 35), što je bilo u skladu sa rezultatom istog testa sa HTR-8/SVneo ćelijama [213]. Svi prethodno dobijeni rezultati u funkcionalnom testu invazije (efekti anti-gal-1 antitela i laktoze) na oba ispitivana modela (izolovani CT i HTR-8/SVneo ćelije) ukazuju na značaj lektinskog tipa interakcija endogenih galektina, a naročito gal-1, za invazivne karakteristike trofoblasta *in vitro*.



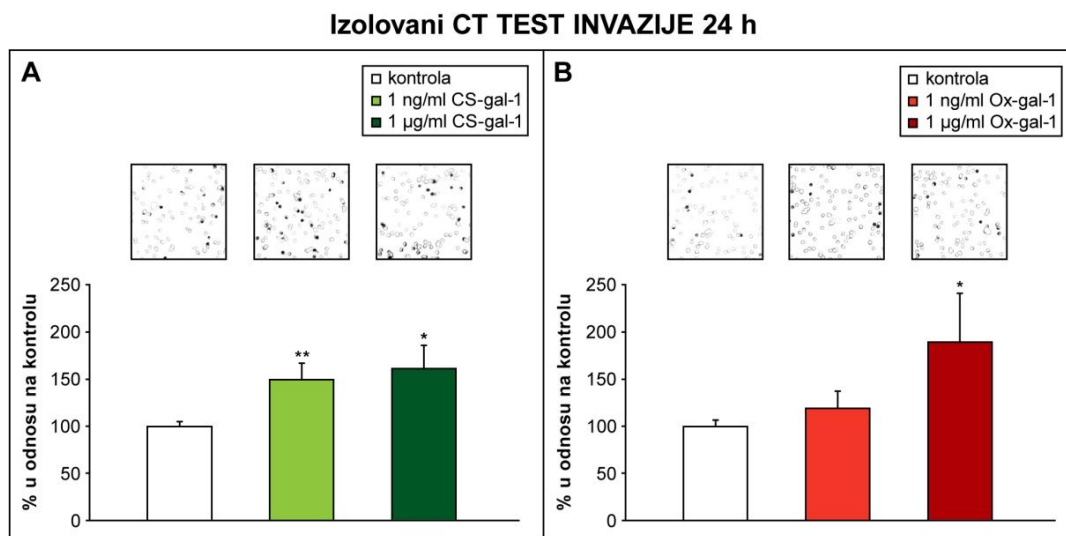
Slika 35. Uticaj 100 mM laktoze na invaziju izolovanog CT. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost broja zauzetih pora \pm SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu. Reprezentativne slike obojenih membrana sa zauzetim porama predstavljene su kvadratima iznad odgovarajućih stubića. Citotrofoblastne ćelije korišćene u ovom eksperimentu izolovane su iz devet placenti prvog trimestra normalne trudnoće. *** označava statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana za $p < 0,001$.

4.6.3. Uticaj egzogenog gal-1 na trofoblastnu invaziju

U sledećem nizu eksperimenata želeli smo da ispitamo da li povećana dostupnost funkcionalnog gal-1 u medijumu ima uticaja na invazivnost trofoblastnih ćelija *in vitro*. Ovaj eksperimentalni pristup ima za cilj da ispita da li bi gal-1 decidualnog porekla takođe mogao da utiče na invazivnost EVT *in vivo*. U tu svrhu u *in vitro* testu invazije Matrigela trofoblastne ćelije su tretirane dvema molekulskim formama rhgal-1. Oba korišćena proteina imaju dokazanu biološku aktivnost, od kojih jedan poseduje lektinsku aktivnost (CS-gal-1), a drugi ne (Ox-gal-1) [168].

4.6.3.1. Uticaj egzogenog gal-1 na invaziju CT

Ispitivan je mogući uticaj gal-1 dodatog u medijum na invaziju izolovanih citotrofoblastnih ćelija upotrebom dveju molekulskih formi rhgal-1 (CS-gal-1 i Ox-gal-1) u koncentracijama od 1 ng/ml i 1 µg/ml. Pokazano je da CS-gal-1 značajno stimuliše invaziju izolovanog CT nakon 24 h, i da taj efekat ne zavisi od koncentracije ovog proteina. Dobijene vrednosti su bile 151% u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$) pri koncentraciji CS-gal-1 od 1 ng/ml i 161% u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$) pri koncentraciji CS-gal-1 od 1 µg/ml (**Slika 36A**). Sa druge strane, Ox-gal-1 je značajno stimulisao invaziju izolovanih CT ćelija samo u 1000 puta višoj koncentraciji (1 µg/ml), i ta vrednost je iznosila 192% u odnosu na kontrolu, gde je $p < 0,05$ (**Slika 36B**). Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da povećana dostupnost funkcionalnog gal-1 doprinosi invazivnosti trofoblastnih ćelija *in vitro*. Pored toga, stimulatorni efekat Ox-gal-1 na trofoblastnu invaziju, navodi na pretpostavku da bi i nelektinski tip interakcija gal-1 mogao biti značajan za funkcionalna svojstva trofoblasta.

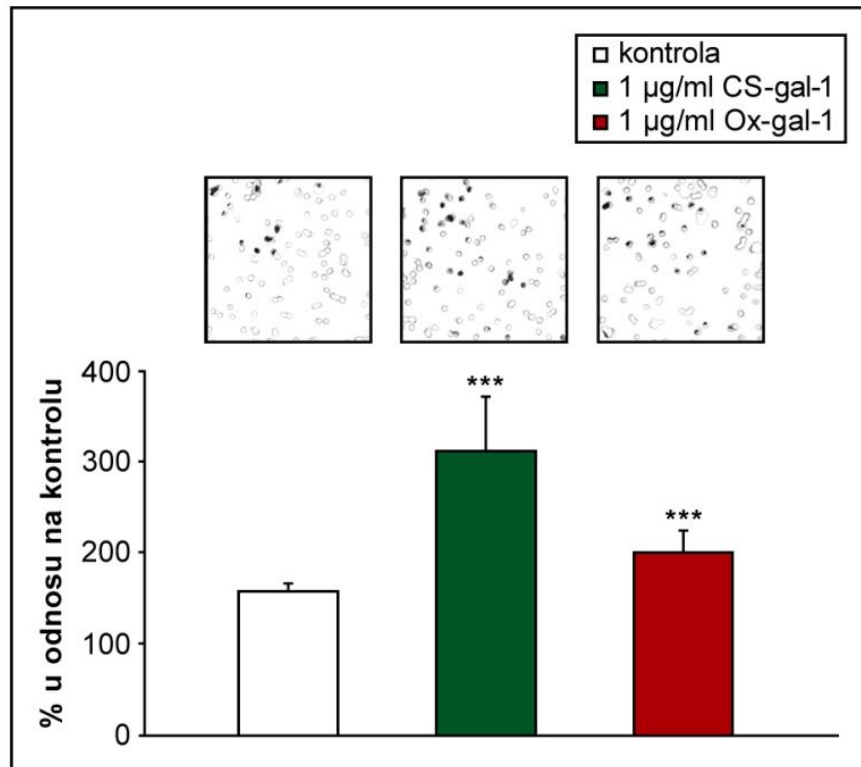


Slika 36. Uticaj različitih koncentracija (1 ng/ml i 1 µg/ml) CS-gal-1 (A) i Ox-gal-1 (B) na invaziju izolovanog CT. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost broja zauzetih pora ± SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu. Reprerzentativne slike obojenih membrana sa zauzetim porama predstavljene su kvadratima iznad odgovarajućih stubića. Citotrofoblastne ćelije korišćene u ovom eksperimentu izolovane su iz četiri placente (CS-gal-1), odnosno pet placenti (Ox-gal-1). Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana i to: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.6.3.2. Uticaj egzogenog gal-1 na invaziju HTR-8/SVneo ćelija

Uticaj egzogenog gal-1 na invaziju trofoblastnih ćelija *in vitro*, ispitivan je i na HTR-8/SVneo ćelijama sa obe forme rhgal-1 u koncentraciji od 1 µg/ml. Nakon 24 h inkubacije, CS-gal-1 sa deklarisanom lektinskom aktivnošću značajno stimuliše invaziju HTR-8/SVneo ćelija (317% u odnosu na kontrolu, $p < 0,001$), dok Ox-gal-1, za koji se očekuje da nema lektinsku aktivnost takođe povećava invaziju do 200% u odnosu na kontrolu, $p < 0,001$) (Slika 37).

HTR-8/SVneo TEST INVAZIJE 24 h



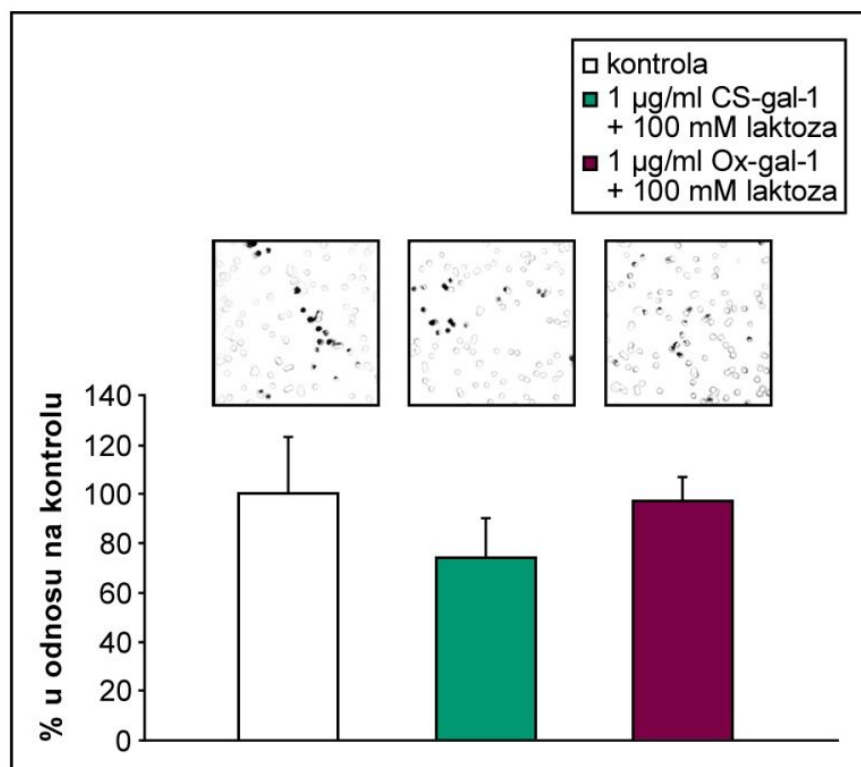
Slika 37. Uticaj CS-gal-1 i Ox-gal-1 (1 µg/ml) na invaziju HTR-8/SVneo ćelija. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost broja zauzetih pora ± SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu; n=6. Reprezentativne slike obojenih membrana sa zauzetim porama predstavljene su kvadratima iznad odgovarajućih stubića. Statistički značajna razlika između kontrole i tretmana za $p < 0,001$ označena je sa ***.

4.6.4. Značaj lektinskog tipa interakcija za invaziju HTR-8/SVneo ćelija stimulisanu egzogenim gal-1

Želeli smo da utvrdimo i u kojoj meri su lektinska svojstva odgovorna za uočene efekte na invaziju HTR-8/SVneo ćelija stimulisanu egzogenim gal-1, uvođenjem u test sistem i inhibitornog šećera laktoze. Dobijeni rezultati su pokazali da posle 24 h laktoza poništava stimulatorni efekat lektinski aktivnog CS-gal-1 na invaziju HTR-8/SVneo ćelija (74% u

odnosu na kontrolu), ali i stimulaciju trofoblastne invazije Ox-gal-1, koji bi trebalo da bude bez lektinske aktivnosti (Slika 38). Ovi rezultati ukazuju na značaj lektinskog tipa interakcija gal-1 koji nije trofoblastnog porekla za invazivna svojstva ćelija trofoblasta u *in vitro* uslovima.

HTR-8/SVneo TEST INVAZIJE 24 h



Slika 38. Uticaj 100 mM laktoze na invaziju HTR-8/SVneo ćelija stimulisane CS-gal-1 i Ox-gal-1 (1 µg/ml). Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost broja zauzetih pora ± SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu. Reprezentativne slike obojenih membrana sa zauzetim porama predstavljene su kvadratima iznad odgovarajućih stubića.

DISKUSIJA

Diferencijacija ekstravilusnog trofoblasta tokom prvog trimestra trudnoće predstavlja ključni korak u formiranju funkcionalne placente čoveka. Taj proces podrazumeva postepenu transformaciju epitelnog fenotipa trofoblasta u mezenhimski (epitelo-mezenhimski tranzicija) ili endotelni fenotip (epitelo-endotelna tranzicija), i okončava se trofoblastnom invazijom različitih tkiva uterusa i remodeliranjem spiralnih arterija majke. Smatra se da je važan aspekt ove transformacije promena integrinskog profila EVT, koja omogućava intersticijalnu i endovaskularnu invaziju trofoblasta [38-41]. Čelije EVT poseduju mnoge karakteristike tumorskih ćelija, međutim, za razliku od tumorskih ćelija, invazija EVT u zid materice je strogo regulisan i vremenski i prostorno ograničen proces. Vremenski i prostorni okvir trofoblastne invazije definisan je nizom složenih i specifičnih interakcija EVT, kako sa različitim ćelijama uterusa, tako i sa brojnim molekulima decidalnog i trofoblastnog porekla u vanćelijskom prostoru. U dostupnoj literaturi postoji mnoštvo podataka koji ukazuju na značaj interakcija membranskih receptora i drugih molekula na površini ćelije sa komponentama vanćelijskog matriksa za proces ćelijske invazije. Dobro je poznato i da ćelije EVT tokom intersticijalne invazije decidue proizvode specifičan vanćelijski matriks, koga čine, između ostalog i visoko glikozilovani proteini poput LN i onfFN, fizioloških liganada galektina-1 [2, 131, 224].

Smatra se da interakcije endogenih lektina, kao što su galektini sa različitim glikokonjugatima mogu imati značajnu ulogu u nekoliko reproduktivnih procesa, uključujući implantaciju embriona i placentaciju [116-121]. Poznato je da se gal-1 sa najvišim afinitetom vezuje za glikoproteine koji sadrže granate, multivalentne N-glikane sa većim brojem LacNAc ponovaka. Galektin-1 se vezuje za brojne glikoproteine vanćelijskog matriksa koji sadrže poli-LacNAc sekvence zavisno od koncentracije [177]. Niz istraživanja je pokazao da interakcije gal-1 sa receptorima na ćelijskoj membrani, kao i sa glikoproteinima vanćelijskog matriksa igraju značajnu ulogu u mnogim ćelijskim procesima, uključujući i ćelijsku adheziju, migraciju i invaziju [159, 178-183, 244]. Povrh toga, rezultati ispitivanja u oblasti biologije tumora ustanovili su direktnu vezu između gal-1 i invazivnosti ćelija [186, 239, 243]. Poirier i saradnici su pokazali da trofektoderm preimplantacione blastociste miša ekspresira gal-1, međutim mutanti koji nisu mogli da sintetišu ovaj lektin su i dalje bili vijabilni i fertilni [117, 201, 219, 220], iako su uočene

neke anomalije nervnog sistema tokom razvića [202]. Ipak, novije *in vivo* studije su ustanovile značajnu ulogu gal-1 u održavanju trudnoće miša [150, 221]. Pokazano je da mutantni soj miševa, koji ne eksprimira gal-1 ima povećanu stopu neuspešnih trudnoća u odnosu na divlji soj, kao i da tretman ovih mutanata rekombinantnim gal-1 sprečava gubitak fetusa [221]. Smatra se da ovaj lektin kao potentni imunomodulator može biti značajan posrednik u komunikaciji između imunskog i endokrinog sistema, a koja je ključna za uspešnost trudnoće [150, 221]. O ulozi gal-1 u trofoblastu čoveka nije bilo mnogo dokumentovanih podataka. Imunohistohemijska bojenja su pokazala da ćelije EVT čoveka diferencijalno eksprimiraju gal-1 duž svog invazivnog puta diferencijacije [206-210]. Potvrđena je i ekspresija ovog lektina u endometriju, kao i u decidui tokom rane trudnoće [170, 208]. Pored toga, pokazano je da dolazi do promena u obrascu ekspresije gal-1 u različitim patološkim stanjima koja uključuju trofoblast [210, 217, 218]. *In vitro* istraživanja na modelu trofoblasta čoveka (horiokarcinomska linija BeWo) su pokazala značajan inhibitorski uticaj ovog lektina na proliferaciju BeWo ćelija [227]. Međutim, mogući uticaj gal-1 na procese ćelijske adhezije, migracije i invazije trofoblasta čoveka, koji su ključni za formiranje funkcionalne placente, bio je nedovoljno ispitan. U ranijim istraživanjima naše laboratorije pokazan je negativan uticaj laktoze (inhibitorskog šećera za lektinski tip interakcija galektina) na invazivnost HTR-8/SVneo ćelija *in vitro* [213], što bi moglo da ukaže na značaj interakcija glikokonjugata i galektina za ćelijsku invaziju. Na osnovu svega navedenog, pretpostavljeno je da bi gal-1 mogao da utiče na funkcionalna svojstva trofoblasta.

Za ispitivanja u ovom radu korišćene su citotrofoblastne ćelije izolovane iz placenti prvog trimestra normalne trudnoće, trofoblastna ćelijska linija HTR-8/SVneo i horiokarcinomska ćelijska linija JAr. Izolovani citotrofoblast u primarnoj kulturi, pri našim eksperimentalnim uslovima pokazuje karakteristike invazivnog ekstravilusnog trofoblasta. S obzirom na činjenicu da izolovane CT ćelije ne proliferišu u kulturi, bilo je neophodno za potrebe ovog istraživanja prevazići ograničenja primarne kulture citotrofoblasta korišćenjem imortalizovane trofoblastne ćelijske linije HTR-8/SVneo. Ova ćelijska linija dobijena je transfekcijom ekstravilusnog trofoblasta čoveka prvog trimestra trudnoće SV40 T antigenom [78, 233], i koristi se za ispitivanja regulatornih mehanizama migracije i

invazije trofoblata [245-247]. Horiokarcinomska ćelijska linija JAr poseduje određene morfološke i funkcionalne sličnosti sa netransformisanim trofoblastnim ćelijama [248]. Prethodna istraživanja naše laboratorije su pokazala da je gal-1 prisutan u izolovanom CT, HTR-8/SVneo i JAr ćelijama [212, 213]. Za ispitivanja u ovom radu su po prvi put korišćena poliklonska antitela prema gal-1 koja blokiraju i funkciju gal-1, što je pokazano u drugim model sistemima. Tako su Horie i saradnici pokazali da ova antitela neutrališu stimulatorni efekat gal-1 na regeneraciju aksona perifernih nerava pacova posle aksotomije *in vivo* i *in vitro* [230]. Eksperimentalnim pristupom korišćenim u ovom radu bili smo u mogućnosti da ispitamo značaj isključivo ekstracelularnog gal-1. Preliminarnim ispitivanjima u ovom radu je pokazano da su korišćena antitela funkcionalna i da imaju kapacitet da blokiraju aktivnost ekstracelularnog gal-1 u trofoblastu. Obzirom da i sam trofoblast proizvodi gal-1, kao i da je poznato da intracelularni gal-1 u drugim sistemima ima značajne biološke funkcije [160, 164, 174-176], postoji mogućnost da i intracelularni gal-1 ostvaruje određene funkcije i u trofoblastu, što međutim, nije ispitivano ovim radom.

Pošto su adhezija, migracija i invazija ćelija trofoblata ključni za uspešnu placentaciju, primarni cilj ovog rada bio je ispitivanje značaja gal-1 za ove procese u trofoblastu funkcionalnim testovima *in vitro*. Prvu indikaciju o mogućem značaju lektinskih interakcija galektina pružili su rezultati eksperimenata u prisustvu inhibitornog šećera laktoze. Raniji rezultati naše laboratorije koji su se odnosili na HTR-8/SVneo ćelije [213], prošireni su ovim radom i na CT. U ispitivanjima značaja lektinskih interakcija za ćelijsku adheziju, korišćeno je više ćelijskih tipova i eksperimentalnih pristupa koji nisu u jednakoj meri pružili uvid u značaj gal-1 za ovaj proces. Kao najdelotvorniji pokazao se sistem u kome je ispitivana adhezija zavisna od supstrata, sa prethodno optimizovanim brojem ćelija i vremenom inkubacije [238], što ujedno objašnjava i odsustvo efekta u drugim korišćenim pristupima. Jedan od ciljeva ovog rada bio je i ispitivanje odnosa povećane dostupnosti funkcionalnog gal-1 i invazivnih karakteristika ćelija trofoblata u *in vitro* uslovima. Ovaj eksperimentalni pristup se zasniva na pretpostavci da gal-1 decidualnog porekla takođe može uticati na invazivnost EVT *in vivo*. U tu svrhu su korišćene dve molekulske forme rhgal-1 dokazane biološke aktivnosti, od kojih jedna poseduje lektinska svojstva (CS-gal-1), a druga ne (Ox-gal-1) [168]. Kako bismo eliminisali mogućnost da

rezultati testa invazije obuhvataju i posledice drugih promena, na primer, naizgled povećana invazija bi mogla poticati od povećanog broja ćelija u toku eksperimenta, ispitivan je i uticaj gal-1 na preživljavanje trofoblastnih HTR-8/SVneo ćelija *in vitro* pomoću MTT testa. U *in vitro* testovima adhezije i invazije trofoblastne ćelije su zasejavane na podlogu obloženu sa tankim slojem Matrigela. Matrigel je adhezivni supstrat koji je po sastavu sličan vanćelijskom matriksu decidualnih ćelija (bogat je kolagenom tipa IV, LN i FN), što ga čini pogodnim za navedene vrste ispitivanja. Migratorne sposobnosti HTR-8/SVneo ćelija su ispitivane na plastičnoj podlozi, tj. bez prisustva supstrata, dok je uticaj šećera na migraciju JAr ćelija ispitivan na podlozi obloženoj Matrigelom.

Ćelijska adhezija igra značajnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima, uključujući i implantaciju embriona. Adhezija ćelije za različite komponente vanćelijskog matriksa ključna je za regulaciju mnogih ćelijskih funkcija [249]. Ćelije ekstravilusnog trofoblasta u medijalnom i distalnom delu ćelijskog stuba [72, 250], kao i HTR-8/SVneo ćelije u kulturi sintetišu vanćelijski matriks bogat onFN i LN, fiziološkim ligandima gal-1. Invazivni citotrofoblast i HTR-8/SVneo ćelije takođe eksprimiraju i specifične integrinske receptore za navedene glikoproteine vanćelijskog matriksa [72, 229, 251]. Galektini koji se izlučuju van ćelije, kao što je gal-1 mogu da formiraju uređene molekulske strukture tzv. galektin-glikan rešetke sa odgovarajućim glikokonjugatima. Obrazovanjem ovakvih rešetki, galektini mogu grupisati specifične glikoproteine i pokrenuti različite signalne kaskade [123, 150]. Pokazano je da gal-1, kao matricelularni protein može dvojako modulirati ćelijsku adheziju (inhibicija ili stimulacija), kako normalnih, tako i tumorskih ćelija. Ova modulacija između ostalog podrazumeva i povezivanje integrinskih receptora preko dgal-1 sa glikoproteinima vanćelijskog matriksa, kao što su LN i FN [178, 180-183]. Postavljena je hipoteza da bi endogeni gal-1 vezujući se za membranske glikoproteine i/ili glikoproteine vanćelijskog matriksa mogao uticati i na adheziju ekstravilusnog trofoblasta. U *in vitro* testu adhezije koji je korišćen u ovom radu je pokazano da anti-gal-1 antitela, kao i inhibitorni šećer laktoza nemaju značajan uticaj na adheziju HTR-8/SVneo ćelija za Matrigel. Međutim, novija istraživanja naše laboratorije su ipak pokazala izvestan značaj interakcija lektinskog tipa za adheziju HTR-8/SVneo ćelija na drugim supstratima [238]. Tako je pokazano da laktoza značajno inhibira adheziju HTR-8/SVneo ćelija za plastiku i

kolagen tipa I. Bilo je očekivano da se sličan efekat u testu adhezije ponovi i korišćenjem anti-gal-1 antitela kao tretmana, međutim, prisustvo anti-gal-1 antitela u medijumu je značajno stimulisalo adheziju ovih ćelija za plastiku, kolagen tipa I i fibronektin [238]. Ova suprotnost između efekata inhibitornog šećera laktoze i anti-gal-1 antitela na adheziju trofoblastnih ćelija *in vitro* verovatno je posledica povećanja broja i složenosti interakcija kada se u test sistem uvedu i anti-gal-1 antitela. Stoga postoji mogućnost da u ovakvom eksperimentalnom modelu anti-gal-1 antitela dodatno ojačavaju postojeće adhezivne komplekse interagujući sa svakim od elemenata. U slučaju horiokarcinomske linije JAr, efekti laktoze i anti-gal-1 antitela na adheziju ovih ćelija za Matrigel donekle su se razlikovali od efekata dobijenih za HTR-8/SVneo ćelije. Međutim, ovo neslaganje može biti posledica razlika između ova dva ćelijska tipa u pogledu prisutnih proteina na membrani ili u vanćelijskom matriksu, i/ili različitog porekla ovih ćelijskih linija (normalni invazivni trofoblast, nasuprot transformisanom trofoblastu horiokarcinoma u slučaju JAr ćelija).

Ćelijska migracija se odvija kroz naizmenično uspostavljanje i raskidanje veza ćelije sa supstratom i dinamičnu reorganizaciju aktinskog citoskeleta. Stoga ćelijska migracija prvenstveno zavisi od repertoara adhezivnih molekula na površini ćelije, sastava supstrata, odnosno vanćelijskog matriksa, zatim jačine vezivanja specifičnih receptora za komponente matriksa, kao i modulacije ovih interakcija drugim molekulima. U literaturi postoji niz podataka o učešću gal-1 u migraciji normalnih i kancerskih ćelija. Pokazano je da gal-1 utiče na migraciju glatkih mišićnih ćelija [178], Švanovih ćelija [252], pigmentnih ćelija retine [253], endotelnih ćelija [254], dendritičnih ćelija [255] i leukocita [256-258]. Moiseeva i saradnici su predložili da se efekat gal-1 na migratorne sposobnosti glatkomišićnih ćelija najverovatnije ostvaruje kroz interakcije ovog lektina sa LN, FN i $\alpha 1\beta 1$ integrinom [178]. Pošto je utvrđeno da invazivni trofoblast, kao i HTR-8/SVneo ćelije u kulturi proizvode LN i onfFN, i eksprimiraju $\alpha 1\beta 1$ integrin, postoji mogućnost da gal-1 na sličan način utiče i na trofoblastnu migraciju. Pored toga, pokazano je i da tretman ovih ćelija laktozom nema značajan efekat na njihove migratorne sposobnosti u *in vitro* uslovima. Međutim, u drugačijem testu migracije, kada je podloga bila obložena tankim slojem Matrigela, laktoza je inhibirala migraciju horiokarcinomskih JAr ćelija. Iako se ovaj

efekat može tumačiti kao rezultat fenotipskih razlika između dva ćelijska tipa, ipak, ne treba isključiti i mogućnost da interakcije lektinskog tipa endogenih galektina, a naročito gal-1 utiču na migratorna svojstva trofoblasta na nekim specifičnim supstratima.

U fokusu ovog rada bilo je ispitivanje moguće uloge gal-1 u invaziji trofoblasta čoveka. Brojni rezultati su ukazivali na mogućnost učešća gal-1 u ovom procesu. Pre svega, oni su se odnosili na obrazac ekspresije gal-1 u trofoblastu *in vivo* i *in vitro* [206-213], povišen nivo ekspresije gal-1 u trofoblastnim malignim bolestima [210], sintezu ovog lektina i u decidualnoj stromi [170], sličnu lokalizaciju gal-1 sa njegovim fiziološkim ligandima, LN i onfFN u placenti [224], inhibitorni uticaj laktoze na invaziju HTR-8/SVneo ćelija *in vitro* [213], kao i pozitivnu korelaciju između ekspresije gal-1 i invazivnosti tumorskih ćelija [186, 243]. Pošto gal-1 sintetišu i ekstravilusne trofoblastne i decidualne stromalne ćelije *in vivo* u ovom radu je ispitivan mogući uticaj kako endogenog, tako i egzogenog gal-1 na invazivna svojstva trofoblasta *in vitro*. Ovim radom je po prvi put pokazan funkcionalni značaj nekog od galektina za invaziju ekstravilusnog trofoblasta *in vitro*, kvalifikujući gal-1 za važnog člana grupe molekula koji omogućavaju invaziju trofoblasta. Dobijeni rezultati su pokazali da blokiranje endogenog gal-1 anti-gal-1 antitelima značajno inhibira invaziju, kako izolovanog CT, tako i HTR-8/SVneo ćelija, što se ne može dovesti u vezu sa nepovoljnim uticajem antitela, pošto anti-gal-1 antitela nisu imala statistički značajan uticaj na preživljavanje HTR-8/SVneo ćelija. Pored toga, pokazan je i značajan inhibitorni uticaj laktoze na invaziju izolovanih citotrofoblastnih ćelija, što je bilo saglasno sa prethodno dobijenim rezultatom za HTR-8/SVneo ćelije i ukazuje na značaj lektinskog tipa interakcija endogenih galektina za trofoblastnu invaziju *in vitro*. U daljim istraživanjima utvrđen je i značaj egzogenog gal-1 za invazivnost trofoblastnih ćelija *in vitro*. Tako je pokazano da povećano prisustvo funkcionalnog gal-1 u medijumu značajno stimuliše invaziju izolovanog CT i HTR-8/SVneo ćelija. Najveću stimulaciju na invaziju trofoblasta imao je CS-gal-1 (čak i pri koncentraciji od 1 ng/ml), dok je efekat Ox-gal-1 bio statistički značajan samo u 1000 puta višoj koncentraciji (1 µg/ml), što ukazuje na značaj lektinskog tipa interakcija gal-1 za ovaj proces. Ova tvrdnja je i dodatno potvrđena poništavanjem stimulatornog efekta CS-gal-1 na invazivnost HTR-8/SVneo ćelija u prisustvu laktoze. Biološki efekti gal-1 koji zavise od njegove molekulske forme, odnosno

lektinskih svojstava opisani su i u drugim sistemima. Tako su Inagaki i saradnici pokazali da oksidovani gal-1 (ne poseduje lektinska svojstva) potpomaže inicijalnu regeneraciju aksona perifernih nerava, dok CS-gal-1 (mutantni protein sa lektinskom aktivnošću) nije značajno uticao na ovaj proces [168]. Pored svega navedenog, saglasnost rezultata dobijenih u testu invazije sa izolovanim citotrofoblastom i HTR-8/SVneo ćelijama pruža i dodatnu potvrdu da je ćelijska linija HTR-8/SVneo pogodan model invazivnog trofoblasta rane trudnoće.

Galektin-1 podstiče proliferaciju ćelija u različitim tkivima (krvni sudovi, slezina, jetra), međutim u nekim drugim, gal-1 ostvaruje suprotno dejstvo (neuroblast, stromalne ćelije kostne srži) [193-197]. U nekim slučajevima, uticaj gal-1 na proliferaciju zavisi od njegove koncentracije. Tako je pokazano da visoke koncentracije gal-1 inhibiraju ćelijsku proliferaciju, dok niske koncentracije gal-1 stimulišu ovaj proces [191, 192]. Jeschke i saradnici su pokazali da gal-1 izolovan iz placente inhibira proliferaciju horiokarcinomskih BeWo ćelija *in vitro* [227]. Kako su stimulatorni efekti CS-gal-1 i Ox-1 na invaziju trofoblasta mogli biti i rezultat uticaja ovih proteina na proliferaciju ćelija, ova mogućnost je ispitana u istim eksperimentalnim uslovima pomoću testa ćelijske vijabilnosti. U ovom ispitivanju korišćene su samo HTR-8/SVneo ćelije, pošto izolovani citotrofoblast ne proliferiše u kulturi. Dobijeni rezultati su pokazali da obe molekulske forme rhgal-1 u svim ispitivanim koncentracijama značajno povećavaju metaboličku aktivnost HTR-8/SVneo ćelija, sugerišući da dolazi do stimulacije proliferacije. Međutim, dalja ispitivanja naše laboratorije su pokazala da ovaj stimulatorni efekat CS-gal-1 i Ox-gal-1 na preživljavanje HTR-8/SVneo ćelija nije bio posledica stimulacije proliferacije ili smanjenja apoptoze [238]. Istraživanja na drugim ćelijskim tipovima su takođe pokazala da gal-1 može uticati na preživljavanje ćelija, bez stimulacije proliferacije [259].

Zbog činjenice da se obrasci ekspresije, kao i funkcije galektina često znatno preklapaju, bilo je neophodno utvrditi galektinski profil invazivnog trofoblasta. Od 11 ispitivanih galektina čoveka ustanovljena je ekspresija gal-1, -3 i -8 na nivou RNK i proteina u izolovanom citotrofoblastu i ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo. Stoga je ovim radom po prvi put utvrđen galektinski profil invazivnog trofoblasta, a tako je otkriven i do sada u trofoblastu neidentifikovani član galektinske familije, gal-8 [238]. Ekspresija gal-8 u

izolovanom citotrofoblastu i HTR-8/SVneo ćelijama potvrđena je i imunocitohemijskim bojenjem, pri čemu je gal-8 bio lokalizovan isključivo u citoplazmi ovih ćelija. Ovaj rezultat je potvrđen i u ispitivanjima lokalizacije gal-1, -3 i -8 u invazivnom trofoblastu *in vitro* od strane naše laboratorije korišćenjem protočne citofluorimetrije [238]. Dobijeni rezultati protočne citofluorimetrije su pokazali da od tri ispitivana galektina, samo gal-1 ima vanćelijsku lokalizaciju, što može objasniti relativno veliki uticaj blokiranja gal-1 na trofoblastnu invaziju i dodatno utemeljuje tvrdnju iznesenu na osnovu rezultata ovog rada, da je gal-1 važan član grupe molekula koji omogućavaju invaziju trofoblasta *in vitro*. Daljim istraživanjima u okviru ovog rada je po prvi put utvrđena i distribucija gal-8 u tkivu normalne placente prvog trimestra. Imunohistohemijskom analizom je pokazano da gal-8 ekspimiraju kako vilusni trofoblast, tako i ekstravilusni trofoblast. Pored toga, pokazana je i ekspresija ovog lektina u decidualnim stromalnim ćelijama i epitelnim ćelijama decidualnih žlezda. U poređnom analizom utvrđeno je znatno preklapanje obrazaca ekspresije gal-1, -3 i -8 unutar normalne placente prvog trimestra, a naročito se to odnosi na imunolokalizaciju ovih galektina u ekstravilusnom trofoblastu. Tako su citotrofoblastne ćelije medijalnog i distalnog dela ćelijskog stuba intenzivno obojene na ova tri galektina (gal-1, -3, -8), dok je njihova ekspresija u intersticijalnom i endovaskularnom trofoblastu drastično smanjena. U ovom radu nije ispitivan mogući značaj gal-8 za funkcionalna svojstva trofoblasta, međutim na osnovu rezultata dobijenih u drugim model sistemima [260, 261], moglo bi se očekivati da gal-8 utiče na različite procese u trofoblastnim ćelijama. Poznato je da gal-8 ostvaruje svoje funkcije kako unutar ćelije, tako i na površini ćelije, odnosno u vanćelijskom prostoru [149]. Kada se izlučuje van ćelije, gal-8 može uticati na ćelijsku adheziju [262, 263], migraciju [261], proliferaciju [264] i apoptozu [265]. Iako imunocitohemijskim bojenjima nije pokazana vanćelijska lokalizacija gal-8 u ćelijama trofoblasta gajenim u kulturi, ipak, postoji mogućnost da nešto drugačiji uslovi gajenja ovih ćelija i drugačiji eksperimentalni pristupi omoguće sagledavanje značaja ekstracelularnog gal-8. U tom slučaju mogle bi se očekivati interakcije gal-8 sa različitim ligandima na površini ćelije i/ili u vanćelijskom matriksu, pa samim tim i uticaj na funkcije trofoblasta. Neophodna su dalja istraživanja kako bi se obezbedio bolji uvid u moguću ulogu drugih ekspimiranih galektina u trofoblastu čoveka.

U ovom radu nije ispitivan mehanizam uticaja gal-1 na invazivnu sposobnost ćelija trofoblasta *in vitro*. Ranija istraživanja naše laboratorije su pokazala povišen nivo ekspresije gal-1 u trofoblastnim malignim bolestima [210]. Brojne studije su utvrdile povezanost povišene ekspresije gal-1 sa invazivnošću kancerskih ćelija. Tako je pokazano da potpuno blokiranje ekspresije gal-1 na nivou RNK u visoko invazivnim kancerskim ćelijama značajno inhibira njihovu invaziju [243, 265]. Utvrđeno je i da prekomerna ekspresija gal-1 u ćelijama oralnog karcinoma značajno povećava ekspresiju i aktivnost MMP-2 i -9 u *in vitro* uslovima [243]. Ispitana je mogućnost da se ovakav mehanizam dejstva gal-1 ostvaruje i u trofoblastnoj invaziji, ali preliminarni rezultati naše laboratorije nisu pokazali značajan uticaj ovog lektina na ekspresiju i aktivnost MMP-2 i -9 u HTR-8/SVneo ćelijama *in vitro*. U dostupnoj literaturi postoje podaci i o direktnoj vezi između hipoksije, ekspresije gal-1 i invazivnosti karcinomskih ćelija [266], što može biti od posebnog značaja za potpunije shvatanje uloge gal-1 u invaziji trofoblasta. Ta pretpostavka se pre svega zasniva na činjenici da se tokom rane trudnoće diferencijacija i invazija trofoblasta odvijaju upravo u hipoksičnim uslovima. Značaj hipoksije za diferencijaciju/invaziju trofoblasta pokazan je u nekoliko studija [108, 115, 267]. Potencijal gal-1 da na površini ćelije obrazuje karakteristične supramolekulske strukture sa različitim glikokonjugatima mogao bi u slučaju trofoblasta rezultovati grupisanjem specifičnih membranskih receptora i pokretanjem brojnih signalnih kaskada. Ipak, sve ove hipoteze potrebno je detaljno ispitati na ćelijskom i molekulskom nivou kako bi se razumeo mehanizam dejstva gal-1 na trofoblastnu invaziju.

Rezultati dobijeni u okviru ovog rada predstavljaju dobru osnovu za dalja ispitivanja biološkog značaja kako samog gal-1, tako i drugih članova galektinske familije koji su eksprimirani u zoni interakcije majke i fetusa za funkcionalna svojstva trofoblasta čoveka. Korišćenje drugačijih eksperimentalnih metoda i istraživanje molekulskih mehanizma regulacije ekspresije i aktivnosti ovih lektina omogućilo bi potpunije razumevanje njihove uloge u procesima adhezije, migracije i invazije trofoblasta *in vivo*, kao ključnih koraka u formiranju funkcionalne placentе čoveka.

ZAKLJUČCI

- Po prvi put je pokazan funkcionalni značaj nekog od galektina za invaziju ekstravilusnog trofoblasta *in vitro*, kvalifikujući gal-1 za važnog člana grupe molekula odgovornih za invazivnost trofoblasta čoveka.
- Pokazano je da endogeni gal-1 učestvuje u invaziji trofoblasta *in vitro*, kao i da dodatni raspoloživi gal-1 stimuliše ovaj proces. Dobijeni podaci ukazuju da bi i u uslovima *in vivo* gal-1 mogao biti uključen u proces trofoblastne invazije, kako autokrinim delovanjem, tako i parakrino, što je potrebno dodatno ispitati.
- Pokazano je da se uticaj gal-1 na invazivna svojstva trofoblasta ostvaruje pre svega njegovom lektinskom aktivnošću.
- Po prvi put je utvrđen galektinski profil invazivnog trofoblasta koji čine gal-1, -3 i -8.
- Pokazano je prisustvo gal-8, do sada u trofoblastu čoveka neidentifikovanog člana galektinske familije.

LITERATURA

1. Bischof P, Irminger-Finger I. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2005;37:1-16.
2. Benirschke K, Kaufmann P, Baergen, RN. *Pathology of the Human Placenta* 5th ed. New York: Springer, 2006.
3. Moore KL, Persaud TVN. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology* 8th ed. Philadelphia: Saunders, 2008.
4. Pijnenborg R, Brosens I, Romero R. *Placental Bed Disorders: Basic Science and its Translation to Obstetrics*. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
5. Hertig AT, Rock J, Adams EC, Menkin MC. Thirty-four fertilized human ova, good, bad and indifferent, recovered from 210 women of known fertility: a study of biologic wastage in early human pregnancy. *Pediatrics* 1959;23:202-11.
6. Burton GJ, Sibley CP, Jauniaux E. *Obstetrics: Normal and Problem Prenancies - Placental anatomy and physiology*. Elsevier, 2007.
7. Baergen RN. *Manual of Pathology of the Human Placenta* 2nd ed. New York: Springer, 2011.
8. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology* 11th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
9. Hertig A, Rock J, Adams E. A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *Am J Anat* 1956;98:297-328.
10. Sudhansu KD, Hyunjung L. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 3rd ed. - Implantation. Elsevier, 2006.

11. Moffet A, Loke C, McLaren A. *Biology and Pathology of Trophoblast*. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.
12. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 1994;266:1508-18.
13. Aplin JD. The cell biological basis of human implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000;14:757-64.
14. Psychoyos A. *Handbook of Physiology - Endocrine Control of Egg Implantation*. Washington, DC: American Physiological Society, 1973.
15. Psychoyos A. Uterine receptivity for nidation. *Ann NY Acad Sci* 1986;476:36-42.
16. de Ziegler D, Fanchin R, de Moustier B, Bulletti C. The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone. *J Reprod Immunol* 1998;39:149-66.
17. Finn CA. The adaptive significance of menstruation. *Hum Reprod* 1994;9:1202-7.
18. Psychoyos A. The "implantation window": can it be enlarged or displaced? *Excerpta Med Int Congr Ser* 1988;768:231-2.
19. Beer AE, Billingham RE. Immunoregulatory aspects of pregnancy. *Fed Proc* 1978;37:2374-8.
20. De Feo V. *Cellular Biology of the Uterus - Decidualization*. Amsterdam: North-Holland, 1967.

21. Kirby DRS, Cowell T. Epithelial-Mesenchymal Interactions - Trophoblast-host interactions. Baltimore: Williams & Wilkins, 1968.
22. Boyd JD, Hamilton WJ. The Human Placenta. Cambridge: Heffer & Sons, 1970.
23. Schlafke S, Enders AC. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol Reprod* 1975;12:41-65.
24. Bentin-Ley U, Horn T, Sjogren A, Sørensen S, Falck Larsen J, Hamberger L. Ultrastructure of human blastocyst-endometrial interactions *in vitro*. *J Reprod Fertil* 2000;120:337-50.
25. Denker HW. Trophoblast-endometrial interactions at embryo implantation: a cell biological paradox. *Trophoblast Res* 1990;4:1-27.
26. Pijnenborg R. Implantation and early placentation. *Current Obstetrics & Gynaecology* 1998;8:8-12.
27. Aplin JD, Kimber SJ. Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2:48.
28. Kaiser R. Über rückbildungsvorgaenge in der dezidua während der schwangerschaft. *Arch Gynäkol* 1960;192:209-20.
29. Iwanaga S. Ultrastructural observations on human endometrial stromal cells during the normal menstrual cycle-with special reference to so-called "predecidual cells". *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1983;35:177-82.
30. Loke YW, King A. Human Implantation: Cell Biology and Immunology. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

31. Burton GJ, Kaufmann P, Huppertz B. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction 3rd ed. - Anatomy and Genesis of the Placenta. Elsevier, 2006.
32. Enders AC. Fine structure of anchoring villi of the human placenta. *Am J Anat* 1968;122:419-51.
33. Enders AC. Cytology of human early implantation. *Res Reprod* 1976;8:1-2.
34. Fisher SJ, Cui TY, Zhang L, Hartman L, Grahl K, Zhang GY, Tarpey J, Damsky CH. Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells *in vitro*. *J Cell Biol* 1989;109:891-902.
35. Morrish E, Dakour J, Li H. Functional regulation of human trophoblast differentiation. *J Reprod Immunol* 1998;39:179-95.
36. Mayhew TM, Leach L, McGee R, Ismail WW, Myklebust R, Lammiman MJ. Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trophoblast at 13-41 weeks of gestation (including observations on annulate lamellae and nuclear pore complexes). *Placenta* 1999;20:407-22.
37. Kosanke G, Kadyrov M, Korr H, Kaufmann P. Maternal anemia results in increased proliferation in human placental villi. *Trophoblast Res* 1998;11:339-57.
38. Vićovac L, Aplin JD. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta Anat* 1996;156:202-16.
39. Zhou Y, Fisher S, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky C. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* 1997;99:2139-51.

40. Damsky CH, Fisher SJ. Trophoblast pseudo-vasculogenesis: faking it with endothelial adhesion receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:660-6.
41. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *Journal of Clinical Investigation* 2004;114:744-54.
42. Soundararajan R, Rao AJ. Trophoblast 'pseudo-tumorigenesis': Significance and contributory factors. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:15.
43. Bulmer JN, Smith J, Morrison L, Wells M. Maternal and fetal cellular relationships in the human placental basal plate. *Placenta* 1988;9:237-46.
44. Mühlhauser J, Crescimanno C, Kaufmann P, Höfler H, Zaccheo D, Castellucci M. Differentiation and proliferation patterns in human trophoblast revealed by c-erbB-2 oncogene product and EGF-R. *J Histochem Cytochem* 1993;41:165-73.
45. Fisher SJ, Damsky CH. Human cytotrophoblast invasion. *Semin Cell Biol* 1993;4:183-8.
46. Blankenship TN, King BF. Developmental expression of Ki-67 antigen and proliferating cell nuclear antigen in macaque placentas. *Develop Dynam* 1994;201:324-33.
47. Kaufmann P, Castellucci M. Extravillous trophoblast in the human placenta. *Trophoblast Res* 1997;10:21-65.
48. Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta* 1980;1:3-19.

49. Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, Dixon G. Trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta* 1981;2:71-92.
50. Kemp B, Kertschanska S, Kadyrov M, Rath W, Kaufmann P, Huppertz B. Invasive depth of extravillous trophoblast correlates with cellular phenotype: a comparison of intra- and extrauterine implantation sites. *Histochem Cell Biol* 2002;117:401-14.
51. Zybina TG, Kaufmann P, Frank HG, Freed J, Kadyrov M, Biesterfeld S. Genome multiplication of extravillous trophoblast cells in human placenta in the course of differentiation and invasion into endometrium and myometrium. I. Dynamics of polyploidization. *Tsitologiya* 2002;44:1058-67.
52. Zybina TG, Frank HG, Biesterfeld S, Kaufmann P. Genome multiplication of extravillous trophoblast cells in human placenta in the course of differentiation and invasion into endometrium and myometrium. II. Mechanisms of polyploidization. *Tsitologiya* 2004;46:640-8.
53. Hustin J, Schaaps JP, Lambotte R. Anatomical studies of the utero-placental vascularisation in the first trimester of pregnancy. *Troph Res* 1988;3:49-60.
54. Burton GJ, Jauniaux E, Watson AL. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy; the Boyd Collection revisited. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:718-24.
55. Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2954-9.

56. Hamilton WJ, Boyd JD. Development of the human placenta in the first three months of gestation. *J Anat* 1960;94:297-328.
57. Ramsey EM, Donner MW. Placental vasculature and circulation. Stuttgart: Georg Thieme, 1980.
58. Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* 1983;4:397-414.
59. De Wolf F, De Wolf Peeters C, Brosens I, Robertson WB. The human placental bed: electron microscopic study of trophoblastic invasion of spiral arteries. *Am J Obstet Gynecol* 1980;137:58-70.
60. Harris LK, Keogh RJ, Wareing M, Baker PN, Cartwright JE, Aplin JD, Whitley GSJ. Invasive trophoblasts stimulate vascular smooth muscle cell apoptosis by a Fas ligand dependent mechanism. *Am J Pathol* 2006;169:1863-74.
61. Robertson WB, Manning PJ. Elastic tissue in uterine blood vessels. *J Pathol* 1974;112:237-43.
62. Craven CM, Morgan T, Ward K. Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta* 1998;19:241-52.
63. Graham CH, Connelly I, Macdougall JR, Kerbel RS, Stetler-Stevenson WG, Lala PK. Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor-beta. *Exp Cell Res* 1994;214:93-9.
64. Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2009;10:445-57.

65. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 2009;188:11-9.
66. Friedl P, Wolf K. Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:129-35.
67. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Rev Cancer* 2003;3:362-74.
68. Lafrenie RM, Yamada KM. Integrin-dependent signal transduction. *J Cell Biochem* 1996;61:543-53.
69. Faull RJ, Kovach NL, Harlan JM, Ginsberg MH. Affinity modulation of integrin alpha5beta1: regulation of the functional response by soluble fibronectin. *J Cell Biol* 1993;121:155-62.
70. Burrows TD, King A, Smith SK, Loke YW. Human trophoblast adhesion to matrix proteins: inhibition and signal transduction. *Hum Reprod* 1995;10:2489-500.
71. Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster M, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 1994;120:3657-66.
72. Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, *in vivo*. *J Clin Invest* 1992;89:210-22.

73. Aplin JD. Expression of the integrin $\alpha 6\beta 4$ by human trophoblast and its loss from extravillous cells. *Placenta* 1993;14:203-11.
74. Irving JA, Lala PK. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGFbeta, IGF-II, and IGFBP-1. *Exp Cell Res* 1995;217:419-27.
75. Ilic D, Genbacev O, Jin F, Caceres E, Almeida E, Bellingard-Dubouchaud V, Schaefer E, Damsky C, Fisher S. Plasma membrane-associated pY397FAK is a marker of cytotrophoblast invasion *in vivo* and *in vitro*. *Am J Pathol* 2001;159:93-108.
76. Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Sakai K, Nagamatsu S, Sakai K, Nakamura Y, Lotfi A, Kawakami H, Iwashita M. Alphavbeta3 integrin signaling pathway is involved in insulin-like growth factor I-stimulated human extravillous trophoblast cell migration. *Endocrinology* 2003;144:1620-30.
77. Zhou Y, Damsky CH, Chui K, Roberts JM, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest* 1993;91:950-60.
78. Irving JA, Lysiak JJ, Graham CH, Hearn S, Han VKM, Lala PK. Characteristics of trophoblast cells migrating from first trimester chorionic villous explants and propagated in culture. *Placenta* 1995;16:413-33.
79. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 1997;99:2152-64.

80. Pereira L, Maidji E, McDonagh S, Tabata T. Insights into viral transmission at the uterine-placental interface. *Trends Microbiol* 2005;13:164-74.
81. Floridon C, Nielsen O, Holund B, Sunde L, Westergaard J, Thomsen S, Teisner B. Localization of E-cadherin in villous, extravillous and vascular trophoblasts during intrauterine, ectopic and molar pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2000;6:943-50.
82. Bamberger AM, Sudahl S, Loning T, Wagener C, Bamberger CM, Drakakis P, Coutifaris C, Makrigiannakis A. The adhesion molecule CEACAM1 (CD66a, C-CAM, BGP) is specifically expressed by the extravillous intermediate trophoblast. *Amer J Pathol* 2000;156:1165-70.
83. Castellucci M, Crescimanno C, Schröter CA, Kaufmann P, Mühlhauser J. *Frontiers in Gynecologic and Obstetric Investigation - Extravillous trophoblast: immunohistochemical localization of extracellular matrix molecules*. New York: Parthenon Publishing Group, 1993.
84. Frank HG, Malekzadeh F, Kertschanska S, Crescimanno C, Castellucci M, Lang I, Desoye G, Kaufmann P. Immunohistochemistry of two different types of placental fibrinoid. *Acta Anat* 1994;150:55-68.
85. Huppertz B, Kertschanska S, Frank HG, Gaus G, Funayama H, Kaufmann P. Extracellular matrix components of the placental extravillous trophoblast: immunocytochemistry and ultrastructural distribution. *Histochem Cell Biol* 1996;106:291-301.
86. Feinberg RF, Kliman HJ, Lockwood CJ. Is oncofetal fibronectin a trophoblast glue for human implantation? *Amer J Pathol* 1991;138:537-43.

87. Kertschanska S, Frank HG, Huppertz B, Kaufmann P. Coexpression of integrins and their ligands in extravillous trophoblast and matrix-type fibrinoid of the human placenta. *Placenta* 1997;18:A32.
88. Aplin JD, Charlton AK, Ayad S. An immunohistochemical study of human endometrial extracellular matrix during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy. *Cell Tissue Res* 1988;253:231-40.
89. Librach CL, Fisher SJ, Fitzgerald ML, Damsky CH. Cytotrophoblast-fibronectin and cytotrophoblast-laminin interactions have distinct roles in cytotrophoblast invasion. *J Cell Biol* 1991;115:6A.
90. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 2008;29:290–308.
91. Anacker J, Segerer SE, Hagemann C, Feix S, Kapp M, Bausch R, Kämmerer U. Human decidua and invasive trophoblasts are rich sources of nearly all human matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod* 2011;17:637-52.
92. Woesnner JJ. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5:2145-54.
93. Fata JE, Ho AT, Leco KJ, Moorehead RA, Khokha R. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:77-95.
94. Moll UM, Lane BL. Proteolytic activity of first trimester human placenta: localization of interstitial collagenase in villous and extravillous trophoblast. *Histochemistry* 1990;94:555-60.

95. Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galarzy R, Damsky CH, Fisher SJ. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol* 1991;113:437-49.
96. Autio-Harminen H, Hurskainen T, Niskasaari K, Hoyhtya M, Tryggvason K. Simultaneous expression of 70 kDa type IV collagenase and type IV collagen 1 (IV) chain genes by cells of early human placenta and gestational endometrium. *Lab Invest* 1992;67:191-200.
97. Polette M, Nawrocki B, Pintiaux A, Massenat C, Maquoi E, Volders L, Schnapps JP, Birembault P, Foidart JM. Expression of gelatinase A and B and their tissue inhibitors by cells of early and term human placenta and gestational endometrium. *Lab Invest* 1994;71:838-46.
98. Vettraino IM, Roby J, Tolley T, Parks WC. Collagenase-I, stromelysin-I, and matrilysin are expressed within the placenta during multiple stages of human pregnancy. *Placenta* 1996;17:557-63.
99. Nawrocki B, Polette M, Marchand V, Maquoi E, Boerchia A, Tournier JM, Foidart JM, Birembaut, P. Membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression at the site of human placentation. *Placenta* 1996;17:565-72.
100. Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases, their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res* 1998;291:133-48.
101. Hurskainen T, Seiki M, Apte SS, Syrjakallio-Ylitalo M, Sorsa T, Oikarinen A, Auto-Harminen H. Production of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT-MMP-

- 1) in early human placenta: a possible role in placental implantation? *J Histochem Cytochem* 1998;46:221-9.
102. Sawicki G, Radomski MW, Winten-Lowen B, Krzymien A, Guilbert LJ. Polarized release of matrix metalloproteinase-2 and -9 from cultured human placental syncytiotrophoblast. *Biol Reprod* 2000;63:1390-5.
103. Hurskainen T, Hoyhtya M, Tuuttila A, Oikarinen A, Auto-Harminen H. mRNA expressions of TIMP-1, -2, and -3 and 92-kDa type IV collagenase in early human placenta and decidual membrane as studied by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1996;44:1379-88.
104. Graham CH, McCrae KR, Lala PK. Molecular mechanisms controlling trophoblast invasion of the uterus. *Trophoblast Res* 1993;7:237-50.
105. Shimonovitz S, Hurwit A, Dushnik M, Anteby E, Geva-Eldar T, Yagel S. Developmental regulation of the expression of 72 and 92 kd type IV collagenases in human trophoblasts: a possible mechanism for control of trophoblast invasion. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:832-8.
106. Graham CH, McCrae KR. Altered expression of gelatinase and surface-associated plasminogen activator activity by trophoblast cells isolated from placentas of preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:555-62.
107. Lala PK, Hamilton GS. Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue. *Placenta* 1996;17:545-55.
108. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 1997;277:1669-72.

109. Lysiak JJ, Han VKM, Lala PK. Localization of transforming growth factor alpha in the human placenta and decidua: role in trophoblast growth. *Biol Reprod* 1993;49:885-94.
110. Bass KE, Morrish DW, Roth I, Bhardway D, Taylor R, Zhou Y, Fisher SJ. Human cytotrophoblast invasion is up-regulated by epidermal growth factor: Evidence that paracrine factors modify this process. *Dev Biol* 1994;164:550-61.
111. Li RH, Zhuang LZ. The effect of growth factors on human normal placental cytotrophoblast proliferation. *Hum Reprod* 1997, 12: 830-4.
112. Librach CL, Feigenbaum SL, Bass KE, Cui TY, Verastas N, Sadovsky Y, Quigley JP, French DL, Fisher SJ. Interleukin-1beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion *in vitro*. *J Biol Chem* 1994;269:17125-31.
113. Jovanović M, Vićovac L. Interleukin-6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line. *Placenta* 2009;30:320-8.
114. Jovanović M, Stefanoska I, Radojčić Lj, Vićovac Lj. Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins $\alpha 5$ and $\beta 1$. *Reproduction* 2010;139:789-98.
115. Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM, Fisher SJ. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion *in vitro* and models the placental defects that occur in preeclampsia. *J Clin Invest* 1996;97:540-50.
116. Moss L, Prakobphol A, Wiedmann TW, Fisher SJ, Damsky CH. Glycosylation of human trophoblast integrins is stage and cell specific. *Glycobiology* 1994;4:567-75.

117. Poirier F, Kimber S. Cell surface carbohydrates and lectins in early development. *Mol Hum Reprod* 1999;3:907-18.
118. Genbacev OD, Prakopbhol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD, Fisher SJ. Trophoblast L-selectin mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 2003;299:405-8.
119. Zhou Y, Genbačev O, Fisher SJ. The human placenta remodels the uterus by using a combination of molecules that governs vascularogenesis or leucocyte extravasation. *Ann NY Acad Sci* 2003;995:73-83.
120. Jones CJP, Aplin JD. Glycosylation at the fetomaternal interface: does the glycode play a critical role in implantation? *Glycoconj J* 2009;26:359-6.
121. Aplin JD, Jones CJP. Fucose, placental evolution and the glycode. *Glycobiology* 2012;22:470-8.
122. Vasta GR, Ahmed H. *Animal Lectins: A Functional View*. Boca Raton: CRC Press, 2009.
123. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. *Essential of Glycobiology* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
124. Spiro RG. Protein glycosylation: Nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 2002;12:43-56.
125. Allen HJ, Kisailus EC. *Glycoconjugates: Composition, structure, and function*. New York: Marcel Dekker, 1992.

126. Kobata A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur J Biochem* 1992;209:483-501.
127. Lis H, Sharon N. Protein glycosylation - Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* 1993;218:1-27.
128. Varki A. Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct. *Glycobiology* 1993;3:97-130.
129. Voet D, Voet JG. *Biochemistry* 4th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2011.
130. Takamoto M, Endo T, Isemura M, Yamaguchi Y, Okamura K, Kochibe N, Kobata A. Structures of asparagine-linked oligosaccharides of human placental fibronectin. *J Biochem* 1987;106:228-35.
131. Zhou Q, Cummings RD. L-14 lectin recognition of laminin and its promotion of *in vitro* cell adhesion. *Arch Biochem Biophys* 1993;300:6-17.
132. McMaster M, Zhou Y, Shorter S, Kapasi K, Geraghty D, Lim KH, Fisher S. HLA-G isoforms produced by placental cytotrophoblasts and found in amniotic fluid are due to unusual glycosylation. *J Immunol* 1998;160:5922-8.
133. Baba E, Erskine R, Boyson JE, Cohen GB, Davis DM, Malik P, Mandelboim O, Reyburn HT, Strominger JL. N-linked carbohydrate on human leukocyte antigen-C and recognition by natural killer cell inhibitory receptors. *Hum Immunol* 2000;61:1202-18.
134. Barondes SH. Bifunctional properties of lectins: Lectins redefined. *Trends Biochem Sci* 1988;13:480-2.

135. Sharon N, Lis H. Lectins 2nd ed. New York: Springer, 2007.
136. Drickamer K. Multiplicity of lectin-carbohydrate interactions. *Nature Struct Biol* 1995;2:437-9.
137. Brewer CF. Multivalent lectin-carbohydrate cross-linking interactions. *Chemtracts - Biochem Mol Biol* 1996;6:165-79.
138. Lee RT, Lee YC. Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction. *Glycoconjugate J* 2000;17:543-51.
139. Monsigny M, Mayer R, Roche AC. Sugar-lectin interactions: sugar clusters, lectin multivalency and avidity. *Carbohydrate Letters* 2000;41:32-52.
140. Lundquist JJ, Toone EJ. The cluster glycoside effect. *Chem Rev* 2002;102:555-78.
141. Nilsson, CL. *Lectins: Analytical Technologies*. Elsevier, 2007.
142. Selman L, Skjodt K, Nielsen O, Floridon C, Holmskov U, Hansen S. Expression and tissue localization of collectin placenta 1 (CL-P1, SRCL) in human tissues. *Mol Immunol* 2008;45:3278-88.
143. Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin concentration during normal human pregnancy. *Hum Reprod* 2000;15:941-3.
144. Harris LK, Jones CJP, Aplin JD. Adhesion Molecules in Human Trophoblast - A Review. II. Extravillous Trophoblast. *Placenta* 2009;30:299-304.

145. Brinkman-Van der Linden EC, Hurtado-Ziola N, Hayakawa T, Wiggleton L, Benirschke K, Varki A, Varki N. Human-specific expression of Siglec-6 in the placenta. *Glycobiology* 2007;17:922-31.
146. Laskarin G, Cupurdija K, Tokmadzic VS, Dorcic D, Dupor J, Juretic K, Strbo N, Crncic TB, Marchezi F, Allavena P, Mantovani A, Randic Lj, Rukavina D. The presence of functional mannose receptor on macrophages at the maternal-fetal interface. *Hum Reprod* 2005;20:1057-66.
147. Gu VY, Wong MH, Stevenson JL, Crawford KE, Brennecke SP, Gude NM. Calreticulin in human pregnancy and pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2008;14:309-15.
148. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994;76:597-8.
149. Klyosov AA, Witczak ZJ, Platt D. *Galectins*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2008.
150. Than NG, Romero R, Kim CJ, McGowen MR, Papp Z, Wildman DE. Galectins: guardians of eutherian pregnancy at the maternal-fetal interface. *Trends Endocrinol Metabol* 2011;23:23-31.
151. Barondes SH, Cooper DNW, Gitt MA, Leffler H. Galectins: structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994;269:20807-10.
152. Kasai K, Hirabayashi J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. *J Biochem Tokyo* 1996;119:1-8.

153. Brewer CF. Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572:255-62.
154. Cooper DNW. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572:209-31.
155. Ahmad N, Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Sabesan S, Roy R, Liu B, Macaluso F, Brewer CF. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem* 2004;279:10841-7.
156. Shirai T, Matsui Y, Shionyu-Mitsuyama C, Yamane T, Kamiya H, Ishii C, Ogawa T, Muramoto K. Crystal structure of a conger eel galectin (congerin II) at 1.45 °A resolution: implication for the accelerated evolution of a new ligand-binding site following gene duplication. *J Mol Biol* 2002;321:879-89.
157. Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, Yagi F, Kasai K. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572:232-54.
158. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major function. *Glycobiology* 2006;16:137-57.
159. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999;1473:172-85.
160. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectin. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572:263-73.

161. Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature Rev Immunol* 2009;9:338-52.
162. Park HJ, Partridge E, Cheung P, Pawling J, Donovan R, Wrana JL, Dennis JW. Chemical enhancers of cytokine signaling that suppress microfilament turnover and tumor cell growth. *Cancer Res* 2006;66:3558-66.
163. Lagana A, Goetz JG, Cheung P, Raz A, Dennis JW, Nabi IR. Galectin binding to Mgat5-modified N-glycans regulates fibronectin matrix remodeling in tumor cells. *Mol Cell Biol* 2006;26:3181-93.
164. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Rev Cancer* 2005;5:29-41.
165. Cho M, Cummings RD. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. *J Biol Chem* 1995;270:5198-206.
166. Leppanen A, Stowell S, Blixt O, Cummings RD. Dimeric galectin-1 binds with high affinity to alpha2,3-sialylated and nonsialylated terminal N-acetyllactosamine units on surface-bound extended glycans. *J Biol Chem* 2005;280:5549-62.
167. Horie H, Kadoya T. Identification of oxidized galectin-1 as an initial repair regulatory factor after axotomy in peripheral nerves. *Neurosci Res* 2000;38:131-7.
168. Inagaki Y, Sohma Y, Horie H, Nozawa R, Kadoya T. Oxidized galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties. *Eur J Biochem* 2000;267:2955-64.

169. Elola MT, Chiesa ME, Alberti AF, Mordoh J, Fink NE. Galectin-1 receptors in different cell types. *J Biomed Sci* 2005;12:13-29.
170. von Wolff M, Wang X, Gabius HJ, Strowitzki T. Galectin fingerprinting in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and in early gestation. *Mol Hum Reprod* 2005;11:189-94.
171. Giordanengo L, Gea S, Barbieri G, Rabinovich GA. Anti-galectin-1 autoantibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection: differential expression of this beta-galactoside-binding protein in cardiac Chagas' disease. *Clin Exp Immunol* 2001;124:266-73.
172. Zuniga E, Gruppi A, Hirabayashi J, Kasai KI, Rabinovich GA. Regulated expression and effect of galectin-1 on *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival. *Infect Immun* 2001;69:6804-12.
173. Lim JW, Kim H, Kim KH. Cell adhesion-related gene expression by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial AGS cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:1284-96.
174. Vyakarnam A, Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* 1997;17:4730-7.
175. Voss PG, Gray RM, Dickey SW, Wang W, Park JW, Kasai K, Hirabayashi J, Patterson RJ, Wang JL. Dissociation of the carbohydrate-binding and splicing activities of galectin-1. *Arch Biochem Biophys* 2008;478:18-25.
176. Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E, Kloog Y. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* 2001;20:7486-93.

177. Moiseeva EP, Javed Q, Spring EL, de Bono DP. Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res* 2000;45:493-502.
178. Moiseeva EP, Spring EL, Baron JH, de Bono DP. Galectin 1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix. *J Vasc Res* 1999;36:47-58.
179. Moiseeva EP, Williams B, Samani NJ. Galectin 1 inhibits incorporation of vitronectin and chondroitin sulfate B into the extracellular matrix of human vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 2003;1619:125-32.
180. Andre S, Kojima S, Yamazaki N, Fink C, Kaltner H, Kayser K, Gabius HJ. Galectins-1 and -3 and their ligands in tumor biology. Non-uniform properties in cell-surface presentation and modulation of adhesion to matrix glycoproteins for various tumor cell lines, in biodistribution of free and liposome-bound galectins and in their expression by breast and colorectal carcinomas with/without metastatic propensity. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:461-74.
181. Ellerhorst J, Nguyen T, Cooper DN, Lotan D, Lotan R. Differential expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in human prostate cancer cell lines and effects of overexpressing galectin-1 on cell phenotype. *Int J Oncol* 1999;14:217-24.
182. Moiseeva EP, Williams B, Goodall AH, Samani NJ. Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:1010-16.
183. van den Brule F, Califice S, Garnier F, Fernandez PL, Berchuck A, Castronovo V. Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin. *Lab Invest* 2003;83:377-86.

184. Clause N, van den Brule F, Waltregny D, Garnier F, Castronovo V. Galectin-1 expression in prostate tumor-associated capillary endothelial cells is increased by prostate carcinoma cells and modulates heterotypic cell-cell adhesion. *Angiogenesis* 1999;3:317-25.
185. Glinskii OV, Huxley VH, Glinsky GV, Pienta KJ, Raz A, Glinsky VV. Mechanical entrapment is insufficient and intercellular adhesion is essential for metastatic cell arrest in distant organs. *Neoplasia* 2005;7:522-7.
186. Harvey S, Zhang Y, Landry F, Miller C, Smith JW. Insights into a plasma membrane signature. *Physiol Genomics* 2001;5:129-36.
187. Cameron AA, Cliffer KD, Dougherty PM, Garrison CJ, Willis WD, Carlton SM. Time course of degenerative and regenerative changes in the dorsal horn in a rat model of peripheral neuropathy. *J Comp Neurol* 1997;379:428-42.
188. Imbe H, Okamoto K, Kadoya T, Horie H, Senba E. Galectin-1 is involved in the potentiation of neuropathic pain in the dorsal horn. *Brain Res* 2003;993:72-83.
189. Watt DJ, Jones GE, Goldring K. The involvement of galectin-1 in skeletal muscle determination, differentiation, and regeneration. *Glycoconj J* 2004;19:615-9.
190. Kami K, Senba E. Galectin-1 is a novel factor that regulates myotube growth in regenerating skeletal muscles. *Curr Drug Targets* 2005;6:395-405.
191. Adams L, Scott GK, Weinberg CS. Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1. *Biochim Biophys Acta* 1996;1312:137-44.

192. Vas V, Fajka-Boja R, Ion G, Dudics V, Monostori E, Uher F. Biphasic effect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells. *Stem Cells* 2005;23:279-87.
193. Sanford GL, Harris-Hooker S. Stimulation of vascular cell proliferation by betagalactoside specific lectins. *FASEB J* 1990;4:2912-2918.
194. Symons A, Cooper DN, Barclay AN. Characterization of the interaction between galectin-1 and lymphocyte glycoproteins CD45 and Thy-1. *Glycobiology* 2000;10:559-63.
195. Maeda N, Kawada N, Seki S, Arakawa T, Ikeda K, Iwao H, Okuyama H, Hirabayashi J, Kasai K, Yoshizato K. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* 2003;278:18938-44.
196. Kopitz J, von Reitzenstein C, Andre S, Kaltner H, Uhl J, Ehemann V, Cantz M, Gabius HJ. Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3. *J Biol Chem* 2001;276:35917-23.
197. Andersen H, Jensen ON, Moiseeva EP, Eriksen EF. A proteome study of secreted prostatic factors affecting osteoblastic activity: galectin-1 is involved in differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 2003;18:195-203.
198. Hirabayashi J, Kasai K. Human placenta β -galactoside-binding lectin purification and some properties. *Biochem Biophys Res Commun* 1984.122:938-44.

199. Joubert R, Kuchler S, Zanetta JP, Bladier D, Avellana-Adalid V, Caron M, Doinel C, Vincendon G. Immunohistochemical localization of a beta-galactoside-binding lectin in rat central nervous system. I. Light- and electron-microscopical studies on developing cerebral cortex and corpus callosum. *Dev Neurosci* 1989;11:397-413.
200. Wollina U, Schreiber G, Gornig M, Feldrappe S, Burchert M, Gabius HJ. Sertoli cell expression of galectin-1 and -3 and accessible binding sites in normal human testis and Sertoli cell only-syndrome. *Histol Histopathol* 1999;14:779-784.
201. Poirier F, Robertson EJ. Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. *Development* 1993;119:1229-36.
202. Puche AC, Poirier F, Hair M, Bartlett PF, Key B. 1996. Role of galectin-1 in the developing mouse olfactory system. *Dev Biol* 1996;179:274-87.
203. Leffler H. Introduction to galectins. *Trends Glycosci Glycotechnol* 1997;9:9-19.
204. Colnot C, Ripoche M, Fowles D, Cannon V, Scaerou F, Cooper DNW, Poirier F. The role of galectins in mouse development. *Trends Glycosci Glycotechnol* 1997;9:31-40.
205. Poirier F. Roles of galectins *in vivo*. *Biochem Soc Symp* 2002;69:95-103.
206. Bevan BH, Kilpatrick DC, Liston WA, Hirabayashi J, Kasai K. Immunohistochemical localization of a β -D-galactoside-binding lectin at the human maternofetal interface. *Histochem J* 1994;26:582-6.
207. Walzel H, Neels P, Bremer H, Kohler H, Raab N, Barten M, Brock J. Immunohistochemical and glycohistochemical localization of the β -galactoside-binding S-type lectin in human placenta. *Acta Histochem (Jena)* 1995;97:33-42.

208. Maqui E, van den Brule FA, Castronovo V, Foidart JM. Changes in the distribution pattern of galectin-1 and galectin-3 in human placenta correlates with the differentiation pathways of trophoblasts. *Placenta* 1997;18:433-9.
209. Vićovac Lj, Janković M, Čuperlović M. Galectin-1 and -3 in cells of the first trimester placental bed. *Hum Reprod* 1998;13:730-5.
210. Božić M, Petronijević M, Milenković S, Atanacković J, Lazić J, Vićovac Lj. Galectin-1 and galectin-3 in the trophoblast of the gestational trophoblastic disease. *Placenta* 2004;25:797-802.
211. Jeschke U, Reimer T, Bergemann C, Wiest I, Schulze S, Friese K, Walzel H. Binding of galectin-1 (gal-1) on trophoblast cells and inhibition of hormone production of trophoblast tumor cells *in vitro* by gal-1. *Histochem Cell Biol* 2004;121:501-8.
212. Bojić-Trbojević ŽT, Janković MM, Vićovac LjM. Influence of IGF-I on adhesion, proliferation and galectin-1 production in JAr and Jeg-3 choriocarcinoma cell lines. *Arch Oncol* 2005;13:7-10.
213. Bojić-Trbojević Ž, Božić M, Vićovac Lj. Steroid hormones modulate galectin-1 in the trophoblast HTR-8/SVneo cell line. *Arch Biol Sci* 2008;60:11-23.
214. van den Brule FA, Price J, Sobel ME, Lambotte R, Castronovo V. Inverse expression of two laminin binding proteins, 67LR and galectin-3, correlates the invasive phenotype of trophoblastic tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201:388-93.
215. Than NG, Pich E, Bellyei S, Szigeti A, Burger O, Berente Z, Janaky T, Boronkai A, Kliman H, Meiri H, Bohn H, Than GN, Sumegi B. Functional analyses of placental protein13/galectin-13. *Eur J Biochem* 2004;271:1065-78.

216. Than NG, Romero R, Goodman M, Weckle A, Xing J, Dong Z, Xu Y, Tarquini F, Szilagyi A, Gal P, Hou Z, Tarca AL, Kim CJ, Kim JS, Haidarian S, Uddin M, Bohn H, Benirschke K, Santolaya-Forgas J, Grossman LI, Erez O, Hassan SS, Zavodszky P, Papp Z, Wildman DE. A primate subfamily of galectins expressed at the maternal-fetal interface that promote immune cell death. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106:9731-6.
217. Liu AX, Jin F, Zhang WW, Zhou TH, Zhou CY, Yao WM, Qian YL, Huang HF. Proteomic analysis on the alteration of protein expression in the placental villous tissue of early pregnancy loss. *Biol Reprod* 2006;75:414-20.
218. Jeschke U, Mayr D, Schiessl B, Mylonas I, Schulze S, Kuhn C, Friese K, Walzel H. Expression of galectin-1, -3 (gal-1, gal-3) and the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in normal, IUGR, preeclamptic and HELLP placentas. *Placenta* 2007;28:1165-73.
219. Poirier F, Timmons PM, Chan CTJ, Guenet JL, Rigby PWJ. Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development. *Development* 1992;115:143-55.
220. Colnot C, Fowles D, Ripoche MA, Bouchaert I, Poirier F. Embryonic implantation in galectin-1/galectin-3 double mutant mice. *Dev Dyn* 1998;211:306-13.
221. Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA, Arck PC. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal interface. *Nature Med* 2007;13:1450-7.
222. Walzel H, Brock J, Pöhland R, Vanselow J, Wolfgang T, Schneider F, Tiemann U. Effects of galectin-1 on regulation of progesterone production in granulosa cells from pig ovaries *in vitro*. *Glycobiology* 2004;14:871-81.

223. Choe YS, Shim C, Choi D, Lee CS, Lee KK, Kim K. Expression of galectin-1 mRNA in the mouse uterus is under the control of ovarian steroids during blastocyst implantation. *Mol Reprod Dev* 1997;48:261-6.
224. Ozeki Y, Matsui T, Yamamoto Y, Funahashi M, Hamako J, Titani K. Tissue fibronectin is an endogenous ligand for galectin-1. *Glycobiology* 1995;5:255-61.
225. Richter DU, Jeschke U, Makovitzky J, Goletz S, Karsten U, Briese V, Friese K. Expression des Thomsen-Friedenreich antigens in der humanen plazenta. *Anticancer Res* 2000;20:5129-34.
226. Jeschke U, Richter DU, Hammer A, Briese V, Friese K, Karsten U. Expression of the Thomsen-Friedenreich antigen and of its putative carrier protein mucin 1 in the human placenta and in trophoblast cells *in vitro*. *Histochem Cell Biol* 2002;117:219-26.
227. Jeschke U, Karsten U, Wiest I, Schulze S, Kuhn C, Friese K, Walzel H. Binding of galectin-1 (gal-1) to the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen on trophoblast cells and inhibition of proliferation of trophoblast tumor cells *in vitro* by gal-1 or an anti-TF antibody. *Histochem Cell Biol* 2006;126:437-44.
228. Fischer I, Redel S, Hofmann S, Kuhn C, Friese K, Walzel H, Jeschke U. Stimulation of syncytium formation *in vitro* in human trophoblast cells by galectin-1. *Placenta* 2010;31:825-32.
229. Aplin JD, Haigh T, Jones CJ, Church HJ, Vićovac L. Development of cytotrophoblast columns from explanted first-trimester human placental villi: role of fibronectin and integrin $\alpha 5\beta 1$. *Biol Reprod* 1999;60:828-38.

230. Horie H, Inagaki Y, Sohma Y, Nozawa R, Okawa K, Hasegawa M, Muramatsu N, Kawano H, Horie M, Koyama H, Sakai I, Takeshita K, Kowada Y, Takano M, Kadoya T. Galectin-1 regulates initial axonal growth in peripheral nerves after axotomy. *J Neurosci* 1999;19:9964-74.
231. Vićovac Lj, Bozić M, Bojić-Trbojević Z, Golubović S. Carcinoembryonic antigen and related molecules in normal and transformed trophoblast. *Placenta* 2007;28:85-96.
232. King A, Thomas L, Bischof P. Cell culture models of trophoblast II: trophoblast cell lines-a workshop report. *Placenta* 2000;21:S113-9.
233. Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res* 1993;206:204-11.
234. Thijssen VL, Hulsmans S, Griffioen AW. The galectin profile in endothelium altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol* 2008;172:545-53.
235. Hanisch FG, Dressen F, Uhlenbruck G. *Lectins and Glycobiology - Quantitative micro-adhesion assay on polystyrene matrices*. New York: Springer, 1993.
236. Hyytiäinen M, Keski-Oja J. Latent TGF-beta binding protein LTBP-2 decreases fibroblast adhesion to fibronectin. *J Cell Biol* 2003;163:1363-74.
237. O'Driscoll L, Linehan R, Liang YH, Joyce H, Oglesby I, Clynes M. Galectin-3 expression alters adhesion, motility and invasion in a lung cell line (DLKP), *in vitro*. *Anticancer Res* 2002;22:3117-25.

238. Kolundžić N, Bojić-Trbojević Ž, Kovačević T, Stefanoska I, Kadoya T, Vićovac L. Galectin-1 is part of human trophoblast invasion machinery - a functional study *in vitro*. PLoS One 2011;6:e28514.
239. Masamune A, Satoh M, Hirabayashi J, Kasai K, Satoh K, Shimosegawa T. Galectin-1 induces chemokine production and proliferation in pancreatic stellate cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006;290:729-36.
240. Tribulatti MV, Cataneo V, Hellman U, Mucci J, Campetella O. Galectin-8 provides costimulatory signals to T lymphocytes. J Leukoc Biol 2009;86:371-80.
241. Lei CX, Zhang W, Zhou JP, Liu YK. Interactions between galectin-3 and integrin β 3 in regulating endometrial cell proliferation and adhesion. Hum Reprod 2009;24:2879-89.
242. He J, Baum L. Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration. Lab Invest 2006;86:578-90.
243. Wu MH, Hong TM, Cheng HW, Pan SH, Liang YR, Hong HC, Chiang WF, Wong TY, Shieh DB, Shiau AL, Jin YT, Chen YL. Galectin-1 mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix-metalloproteinase expression and reorganized actin cytoskeletons. Mol Cancer Res 2009;7:311-8.
244. Hsu DK, Liu FT. Regulation of cellular homeostasis by galectins. Glycoconj J 2004;19:507-155.
245. Gleeson LM, Chakraborty C, McKinnon T, Lala PK. Insulin-like growth factor-binding protein 1 stimulates human trophoblast migration by signaling through alpha 5 beta 1 integrin via mitogen-activated protein kinase pathway. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:2484-93.

246. Chakraborty C, Barbin YP, Chakrabarti S, Chidiac P, Dixon SJ, Lala PK. Endothelin-1 promotes migration and induces elevation of $[Ca^{2+}]_i$ and phosphorylation of MAP kinase of a human extravillous trophoblast cell line. *Mol Cell Endocrinol* 2003;201:63-73.
247. Huber AV, Saleh L, Bauer S, Husslein P, Knöfler M. TNF α -mediated induction of PAI-1 restricts invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells. *Placenta* 2006;27:127-36.
248. Patillo RA, Ruckert A, Hussa R, Bernstein R, Delfs E. The JAr cell line-continuous human multihormone production and controls. *In vitro* 1971;6:398-9.
249. Taga M, Suginami H. Cell Adhesion and Reproduction. *Horm Res* 1998;50:2-6.
250. Korhonen M, Virtanen I. The distribution of laminins and fibronectins is modulated during extravillous trophoblastic cell differentiation and decidual cell response to invasion in the human placenta. *J Histochem Cytochem* 1997;45:569-81.
251. Chakraborty C, Gleeson LM, McKinnon T, Lala PK. Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. *Can J Physiol Pharmacol* 2002;80:116-24.
252. Fukaya K, Hasegawa M, Mashitani T, Kadoya T, Horie H, Hayashi Y, Fujisawa H, Tachibana O, Kida S, Yamashita J. Oxidized galectin-1 stimulates the migration of Schwann cells from both proximal and distal stumps of transected nerves and promotes axonal regeneration after peripheral nerve injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:162-72.
253. Alge CS, Priglinger SG, Kook D, Schmid H, Haritoglou C, Welge-Lussen U, Kampik A. Galectin-1 influences migration of retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:415-26.

254. Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, Dings RP, Nesmelova I, Satijn S, Verhofstad N, Nakabeppu Y, Baum LG, Bakkers J, Mayo KH, Poirier F, Griffioen AW. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:15975-80.
255. Fulcher JA, Hashimi ST, Levroney EL, Pang M, Gurney KB, Baum LG, Lee B. Galectin-1-matured human monocyte-derived dendritic cells have enhanced migration through extracellular matrix. *J Immunol* 2006;177:216-26.
256. Rabinovich, GA, Sotomayor CE, Riera CM, Bianco I, Correa SG. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur J Immunol* 2000;30:1331-9.
257. Delbrouck C, Doyen I, Belot N, Decaestecker C, Ghanooni R, de Lavarelle A, Kaltner H, Choufani G, Danguy A, Vandenhoven G, Gabius HJ, Hassid S, Kiss R. Galectin-1 is overexpressed in nasal polyps under budesonide and inhibits eosinophil migration. *Lab Invest* 2002;82:147-58.
258. La M, Cao TV, Cerchiaro G, Chilton K, Hirabayashi J, Kasai KI, Oliani SM, Chernajovsky Y, Peretti M. A novel biological activity for galectin-1. Inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. *Am J Pathol* 2003;163:1505-15.
259. Endharti AT, Zhou YW, Nakashima I, Suzuki H. Galectin-1 supports survival of naive T cells without promoting cell proliferation. *Eur J Immunol* 2005;35:86-97.
260. Hadari YR, Arbel-Goren R, Levy Y, Amsterdam A, Alon R, Zakut R, Zick Y. Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J Cell Sci* 2000;113:2385-97.

261. Nagy N, Bronckart Y, Camby I, Legendre H, Lahm H, Kaltner H, Hadari Y, Van Ham P, Yeaton P, Pector JC, Zick Y, Salmon I, Danguy A, Kiss R, Gabius HJ. Galectin-8 expression decreases in cancer compared and dysplastic human colon tissue and acts significantly on human colon cell migration as a supressor. *Gut* 2002;50:392-401.
262. Levy Y, Arbel-Goren R, Hadari YR, Eshhar S, Ronen D, Elhanany E, Geiger B, Zick Y. Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion. *J Biol Chem* 2001;276:31285-95.
263. Zick Y, Einstein M, Arbel-Goren R, Hadari YR, Levy Y, Ronen D. Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth. *Glycoconj J* 2004;19:517-26.
264. Tribulatti MV, Mucci J, Cattaneo V, Agüero F, Gilmartin T, Head SR, Campetella O. Galectin-8 induces apoptosis in the CD4^{high}CD8^{high} thymocyte subpopulation. *Glycobiology* 2007;17:1404-12
265. Roda O, Ortiz-Zapater E, Martínez-Bosch N, Gutiérrez-Gallego R, Vila-Perelló M, Ampurdanés C, Gabius HJ, André S, Andreu D, Real FX, Navarro P. Galectin-1 is a novel functional receptor for tissue plasminogen activator in pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2009;136:1379-90.
266. Zhao XY, Chen TT, Xia L, Guo M, Xu Y, Yue F, Jiang Y, Chen GQ, Zhao KW. Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 2010;31:1367-75.
267. Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, Gassman M, Lye SJ, Kuliszewski M, Post M. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFβ₃. *J Clin Invest* 2000;105:577-87.

BIOGRAFIJA AUTORA

Nikola M. Kolundžić, istraživač saradnik, rođen je 28.04.1983. godine u Kninu (Hrvatska). Osnovnu i srednju školu završio je u Rumi. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Biologija) upisao je školske 2001/2002 godine. Diplomirao je 2006. godine sa prosečnom ocenom 9,41. Školske 2006/2007 godine upisao je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija ćelija i tkiva. Od 2007. godine zaposlen je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za biologiju reprodukcije Instituta za primenu nuklearne energije - INEP, Univerziteta u Beogradu, a u zvanje istraživač saradnik izabran je 2010 godine.

Od 2007. do 2010. godine bio je angažovan na projektu 143059 „Ćelijske interakcije i molekularni mehanizmi u diferencijaciji ćelija u implantaciji embriona i placentaciji“ finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. U periodu od 2011. do 2014. godine uključen je u projekat 173004 „Trofoblast i ekstraembrionalne fetalne ćelije: plastičnost, faktori diferencijacije i *in vitro* modulacija funkcionalnih svojstava“ finansiranog od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradio je u Odeljenju za biologiju reprodukcije pod mentorstvom dr Ljiljane Vićovac Panić, naučnog savetnika Instituta za primenu nuklearne energije - INEP, Univerziteta u Beogradu.

Do sada je objavio 3 naučna rada u časopisima međunarodnog značaja. Prema Science Citation Index-u citiran je pet puta, uz jedan autocitat.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Никола М. Колунџић

број индекса В0060198

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

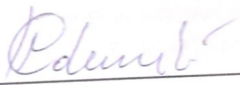
„Галектин-1 и функционална својства

ћелија трофобласта човека *in vitro*“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 15. 11. 2012.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Никола М. Колунџић

Број индекса ВО060198

Студијски програм Биологија ћелија и ткива

Наслов рада „Галектин-1 и функционална својства ћелија
трофобласта човека *in vitro*“

Ментори др Љиљана Вићовац Панић, научни саветник Института за примену
нуклеарне енергије - ИНЕП Универзитета у Београду

др Александра Кораћ, редовни професор Биолошког факултета
Универзитета у Београду

Потписани Никола М. Колунџић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду. 15. 11. 2012.

Колунџић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Галектин-1 и функционална својства

ћелија трофобласта човека *in vitro*“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 15. 11. 2012.

