

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ivana M. Stefanoska

**UTICAJ PROLAKTINA NA ĆELIJE
TROFOBLASTA ĆOVEKA *in vitro***

doktorska disertacija

Beograd, 2013

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Ивана М. Стефаноска

**УТИЦАЈ ПРОЛАКТИНА НА ЋЕЛИЈЕ
ТРОФОБЛАСТА ЧОВЕКА *in vitro***

докторска дисертација

Београд, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivana M. Stefanoska

**THE EFFECT OF PROLACTIN ON HUMAN
TROPHOBLAST *in vitro***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

KOMISIJA

dr Ljiljana Vićovac Panić, mentor

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

dr Jelena Đorđević, mentor

vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Milica Jovanović Krivokuća, član

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

dr Saša Vasiljić, član

docent Medicinskog fakulteta - VMA Univerziteta odbrane u Beogradu

Eksperimentalni deo ove doktorske teze urađen je u Institutu za primenu nuklearne energije – INEP, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekata Ministarstva prosvete i nauke "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 rukovodstvom dr Ljiljane Vićovac Panić, naučnog savetnika INEP-a.

Dr Ljiljani Vićovac Panić dugujem najveću zahvalnost na strpljenju, podršci, razumevanju i velikoj pomoći tokom izrade ove doktorske teze.

Zahvaljujem se dr Jeleni Đorđević, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu za pomoć u završnoj obradi teze i mnogim korisnim sugestijama.

Posebno se zahvaljujem dr Milici Jovanović Krivokuća, naučnom saradniku INEP-a na velikoj pomoći i korisnim savetima tokom svih faza izrade ove teze.

Zahvaljujem se dr Saši Vasiljiću, docentu Medicinskog fakulteta – VMA, Univerziteta odbrane na korisnim savetima i sugestijama.

Zahvaljujem se dr Nikoli Kolundžiću na nesebičnoj pomoći u kompjuterskoj obradi rezultata ove doktorske teze.

Svojim dragim kolegicama, Žani, Tamari i Danici zahvaljujem na stručnoj pomoći i prijateljskoj podršci.

Zahvaljujem se i ostalim kolegama Instituta na korisnim savetima i podršci.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima i porodici na ljubavi, razumevanju i podršci tokom svih ovih godina.

REZIME

Prolaktin (PRL) je polipeptidni hormon koji utiče na rast i diferencijaciju različitih ćelija, a uključen je i u brojne fiziološke procese. Sintetiše ga i luči hipofiza, ali i različita druga tkiva i ćelije. Prolaktin je jedan od glavnih proteina koji sintetiše i sekretuje decidualizovani endometrijum. Produkcija decidualnog prolaktina se povećava u trudnoći nakon implantacije, i dostiže maksimum u tkivu decidue 20 do 25 nedelje gestacije.

Delovanje PRL se ostvaruje vezivanjem za PRL receptore (PRLR) na ćelijskoj membrani. Poznato je da se za prolaktinski receptor vezuje najmanje tri liganda - prolaktin, placentni laktogen i hormon rasta. Do sada je za placentu poznato da je receptor za prolaktin ispoljen u decidui, trofoblastu horiona, epitelu amniona i sinciciotrofoblastu na kraju trudnoće. Prolaktin u različitim ćelijama i tkivima utiče na ekspresiju adhezivnih i proteolitičkih molekula koji su značajni za degradaciju ekstraćelijskog matriksa i ćelijsku migraciju. Međutim, njegova uloga u trofoblastu nije dovoljno poznata.

Ovim radom je po prvi put ispitivan uticaj prolaktina na svojstva invazivnog ekstravilusnog trofoblasta prvog trimestra trudnoće. Detektovana je ekspresija PRLR, kao i profil prisutnih formi receptora na izolovanim citotrofoblastnim ćelijama i HTR-8/SVneo trofoblastnoj imortalizovanoj ćelijskoj liniji. Pokazali smo da PRL stimuliše adheziju, migraciju i invaziju trofoblasta *in vitro*. Kao potencijalne efekte ispitivali smo integrine, gal-1 i matriksne metaloproteinaze-2 i -9. Dobijeni rezultati ukazuju da PRL stimuliše ekspresiju subjediničnog integrina α_1 , α_5 , kao i gal-1. Ispitivali smo i efekat PRL na vijabilnost, proliferaciju i apoptozu HTR-8/SVneo ćelija. PRL je blago stimulisao vijabilnost i uticao na povećanje broja adherentnih ćelija, dok apoptoza nije bila značajno promenjena.

Dobijeni rezultati predstavljaju napredak u razumevanju fiziološke uloge PRL značajne za funkciju humanog trofoblasta. Takođe, ovaj rad pruža celovitiji uvid u proces diferencijacije ranog trofoblasta i predstavlja dobru osnovu za dalja ispitivanja biološke uloge prolaktina, kao i drugih članova ove familije proteina u humanom trofoblastu.

Ključne reči: prolaktin, PRLR, trofoblast, izolovani citotrofoblast, HTR-8/SVneo.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija reprodukcije

UDK broj: 577.175.3 + 618.14] : 612.63.025.2 (043.3)

ABSTRACT

Prolactin (PRL) is a polypeptide hormone which has impact on the growth and differentiation of various cell types, and is known to participate in numerous physiological processes. It is synthesized and secreted by the pituitary gland and many other tissues and cell types. Prolactin is also one of the major proteins synthesized and secreted by decidualized endometrium. The production of decidual prolactin increases after implantation, and peaks in decidual tissue at 20 to 25th week of gestation.

The action of PRL is exerted through binding to its receptors (PRLR) at the surface of target cells. It is known that prolactin receptor has at least three ligands – prolactin, placental lactogen and growth hormone. Regarding localization of prolactin receptor in placenta, so far it has been found in decidua, chorionic trophoblast, amniotic epithelium and syncytiotrophoblast at term. Prolactin affects the expression of adhesion and proteolytic molecules which are important for degradation of extracellular matrix and cell migration. However, its role in trophoblast is not well defined.

In this study the effect of prolactin on the function of first trimester of pregnancy extravillous trophoblast was studied for the first time. The expression of PRLR, as well as the profile of different isoforms was examined in both cytotrophoblast and HTR-8/SVneo trophoblast derived cell line. It is shown here that PRL stimulates trophoblast cell adhesion, migration and invasion *in vitro*. Potential effectors were sought among integrins, gal-1 and matrix metalloproteinases-2 and -9. The results showed that PRL stimulated the expression of integrin subunits α_1 , α_5 , as well as gal-1. When investigating the effect of PRL on cell viability, proliferation and apoptosis of HTR-8/SVneo cells, PRL was found to slightly stimulate cell viability and adherent cell number, while apoptosis was not altered.

The results of this study represent a step further in the understanding of the physiological role of PRL in human trophoblast. Moreover, this work gives a better insight in to the process of early trophoblast differentiation and represents a good basis for further

studies of the biological role of prolactin, as well as other members of this family of proteins in the human trophoblast.

Key words: prolactin, PRLR, trophoblast, isolated cytotrophoblast, HTR-8/SVneo.

Scientific field: Biology

Special topic: Biology of reproduction

UDC number: 577.175.3 + 618.14] : 612.63.025.2 (043.3)

SKRAĆENICE

ABC - avidin biotin peroksidazni kompleks

BSA - goveđi serumski albumin

CK - citokeratin

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 hranljivom mešavinom

ECM - vanćelijski matriks

EGF - epidermalni faktor rasta

EPO - eritropoetin

EVT - ekstravilusni trofoblast

FCS - fetalni teleći serum

Gal - galektin

GH - hormon rasta

GHR - receptor hormona rasta

HLA - humani leukocitni antigen

HTR-8/SVneo - humana ekstravilusna trofoblastna ćelijska linija

IGF - insulinu-sličan faktor rasta

IGFBP-1 - insulinu-sličan faktor rasta vezujući protein-1

MMP - matriksna metaloproteinaza

MTT - 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromid

MUC1 - mucin 1

PBS - fosfatni pufer

PGH - placentni hormon rasta

PL - placentni laktogen

PRL - prolaktin

PRLR - receptor za prolaktin

ROS - reaktivne kiseonične vrste

RPMI 1640 - medijum za gajenje HTR-8/SVneo ćelija

SDS-PAGE - natrijum-dodecil-sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza

ST - sinciotrofoblast

TIMP - tkivni inhibitor matriksnih metaloproteinaza

TGF- α - transformišući faktor rasta alfa

TGF- β - transformišući faktor rasta beta

uNK - ćelije „prirodne ubice“ uterusa

VCAM-1 - vaskularni ćelijski adhezioni molekul-1

VEGF - vaskularni endotelni faktor rasta

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1.1. Placenta – struktura i funkcija	2
1.2. Stadijumi implantacije embriona čoveka	4
1.2.1. Preimplantaciona faza	4
1.2.2. Implantacija i placentacija.....	7
1.2.3. Diferencijacija trofoblasta	10
1.2.3.1. Vilusni trofoblast	11
1.2.3.2. Ekstravilusni trofoblast.....	11
1.2.3.2.1. Intersticijalni trofoblast.....	12
1.2.3.2.2. Endovaskularni trofoblast.....	13
1.3. Ćelijski adhezioni molekuli i implantacija	15
1.4. Uloga galektina-1 u trofoblastnoj invaziji	17
1.5. Matriksne metaloproteinaze	18
1.6. Decidualizacija	20
1.6.1. Decidualizacija i prolaktin	21
1.7. Prolaktin, hormon rasta, placentni laktogen i trudnoća	23
1.7.1. Prolaktin	26

1.7.1.1.	Struktura prolaktina	26
1.7.1.2.	Biološka funkcija prolaktina.....	28
1.7.1.3.	N – terminalni 16 kDa fragment prolaktina i trudnoća.....	29
1.7.1.4.	Uloga prolaktina u trudnoći	30
1.7.1.5.	Prolaktinski receptor (PRLR)	33
CILJ ISTRAŽIVANJA.....		39
MATERIJAL I METODE.....		41
3.1.	Antitela.....	42
3.2.	Tkivni uzorci.....	43
3.3.	Kultura ćelija.....	43
3.3.1.	Izolovanje i kultura citotrofoblastnih ćelija prvog trimestra	43
3.3.2.	Ekstravilusna trofoblastna ćelijska linija HTR-8/SVneo.....	45
3.4.	Imunohistohemija	46
3.5.	Imunocitohemija	46
3.6.	Izolovanje limfocita iz periferne krvi	47
3.7.	Protočna citofluorimetrija	48
3.8.	Funkcionalni testovi.....	49
3.8.1.	Test ćelijske adhezije <i>in vitro</i>	49
3.8.2.	Test ćelijske migracije <i>in vitro</i> metodom “Wound healing”	49

3.8.3.	Test ćelijske invazije <i>in vitro</i>	50
3.9.	Odredjivanje vijabilnosti ćelija (MTT test)	51
3.10.	Detekcija i kvantifikacija adherentnih ćelija (Crystal violet test).....	52
3.11.	SDS poliakrilamidna gel elektroforeza i Western blot.....	52
3.12.	Zimografsko određivanje aktivnosti enzima	53
3.13.	Statistička analiza.....	54
REZULTATI		52
4.1.	Prolaktin.....	56
4.1.1.	Ekspresija PRLR u tkivu placentnog ležišta prvog trimestra	56
4.2.	Ekspresija PRLR na izolovanim citotrofoblastnim i HTR-8/SVneo ćelijama.....	58
4.3.	Prisustvo različitih izoformi prolaktinskog receptora na izolovanom citotrofoblastu i HTR-8/SVneo ćelijama.....	61
4.4.	Uticaj prolaktina na funkcionalna svojstva trofoblasta <i>in vitro</i>	62
4.4.1.	Efekat prolaktina na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija.....	63
4.4.2.	Uticaj prolaktina na broj adherentnih ćelija	63
4.4.3.	Efekat prolaktina na proliferaciju HTR-8/SVneo ćelija.....	64
4.4.4.	Uticaj prolaktina na apoptozu HTR-8/SVneo ćelija.....	66
4.4.5.	Uticaj prolaktina na adheziju HTR-8/SVneo ćelija.....	68
4.4.6.	Uticaj prolaktina na migraciju HTR-8/SVneo ćelija	70

4.4.7. Uticaj prolaktina na invaziju ekstravilusnih trofoblastnih i HTR-8/SVneo ćelija	72
4.5. Uticaj prolaktina na proteine od značaja za invaziju trofoblasta	73
4.5.1. Uticaj prolaktina na ekspresiju α_1 i α_5 subjedinica integrina	74
4.5.2. Uticaj prolaktina na ekspresiju gal-1	75
4.5.3. Uticaj prolaktina na aktivnost MMP-2 i MMP-9	76
DISKUSIJA	83
ZAKLJUČCI	93
LITERATURA	97

UVOD

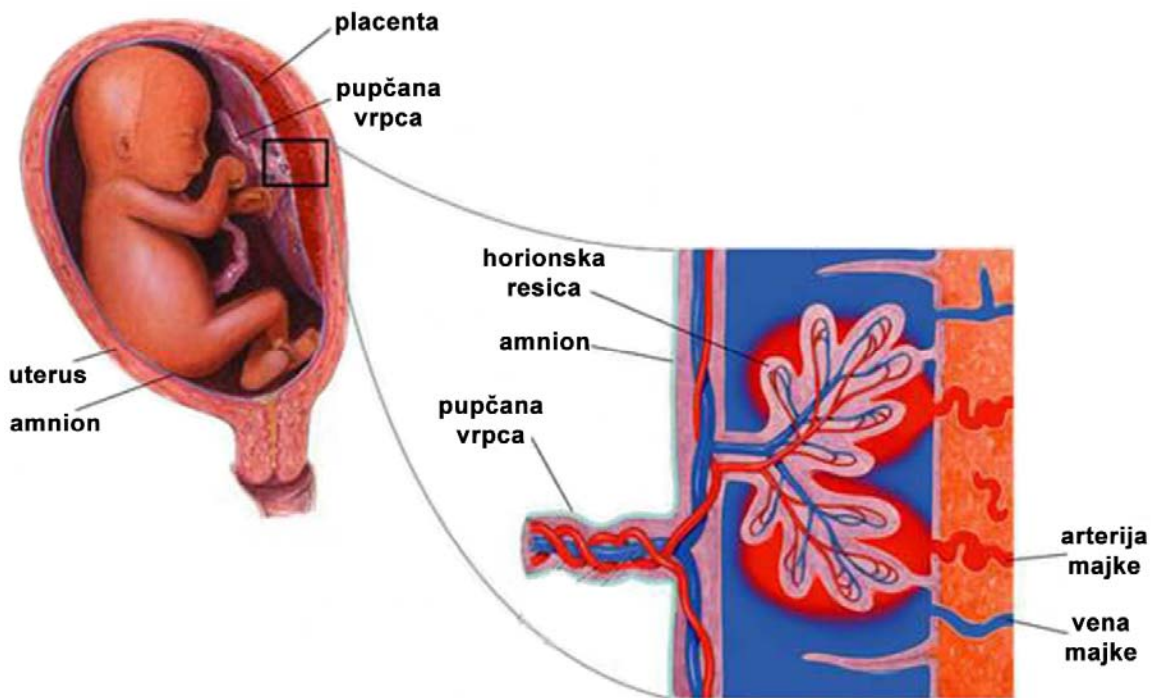
1.1. Placenta – struktura i funkcija

Placenta je autonomni organ preko kojeg se prenose hranljive materije i gasovi između fetusa i majke, i kao takva neophodna je za rast i razviće embriona. Razvoj placente počinje implantacijom, a sam proces naziva se placentacija. Oba procesa karakterišu značajne promene u zidu uterusa u odgovoru na različite modulatorne molekule, kao što su steroidi i peptidni hormoni, kao i lokalni faktori, sa ciljem da se formira pogodna sredina za implantaciju blastociste i razvoj embriona (Lunghi i sar., 2007).

Tokom procesa placentacije razvijaju se horionske resice koje čine osnovnu funkcionalnu i strukturnu jedinicu placente. One su ili pričvršćene za zid uterusa – sidreće resice (*villi atherentes*) ili plivaju u intervulusnom prostoru – slobodne resice (*villi terminales*; Tarrade i sar., 2001).

Obrazovanjem horionskih resica povećava se kontaktna površina horiona i tkiva materice, i uspostavlja komunikacija između embrionalnog i majčinog krvotoka. Bez obzira na postojanje intimne veze između ovih krvotoka, nikada ne dolazi do mešanja krvi majke i fetusa. Preko resica se odvija apsorpcija nutrijenata, eliminacija ekskreta, a one su i mesto produkcije mnoštva hormona koje stvara placenta tokom trudnoće.

Horionske resice su u početku razvijene po celoj površini horiona, a kasnije se povećavaju i granaju samo na mestima gde se vrši izmena materija između embrionalnog i majčinog tkiva (**Slika 1**). Same resice su prekrivene trofoblastom koji predstavlja embrionalno tkivo i ima značajnu ulogu u procesu implantacije i placentacije (Aplin, 1998; Benirschke i Kaufmann, 2000; Lunghi i sar., 2007).



Slika 1. Shematski prikaz strukture placente

Trofoblast horionske resice čine sinciotrofoblast (ST) i citotrofoblast (CT). Citotrofoblast predstavlja prekursor za ostale populacije trofoblasta. Sinciotrofoblast naleže na sloj ćelija citotrofoblasta, dok bazalna membrana ovih ćelija naleže na centralni deo horionske resice, koji je ispunjen vezivom, fetalnim kapilarima i fetalnim makrofagima – Hofbauerovim ćelijama.

Sinciotrofoblast predstavlja mnogojedarnu protoplazmatičnu masu, preko kojeg se odvija brza razmena materija i informacija. Citotrofoblast čine nediferencirane, proliferišuće ćelije kuboidnog oblika sa okruglim jedrom. Fuzijom ovih ćelija nastaje sinciotrofoblast koji se nalazi na površini resice, kao i ekstravilusni citotrofoblast koji vrši invaziju duboko u zid uterusa (Benirschke i Kaufmann, 2000).

Horionske resice veoma brzo rastu i granaju se, tako da resice koje su u vezi sa bazalnom deciduom formiraju fetalnu komponentu placente, *chorion frondosum* (čupavi horion), dok resice na površini horiona okrenute prema uterusnoj šupljini koje su u

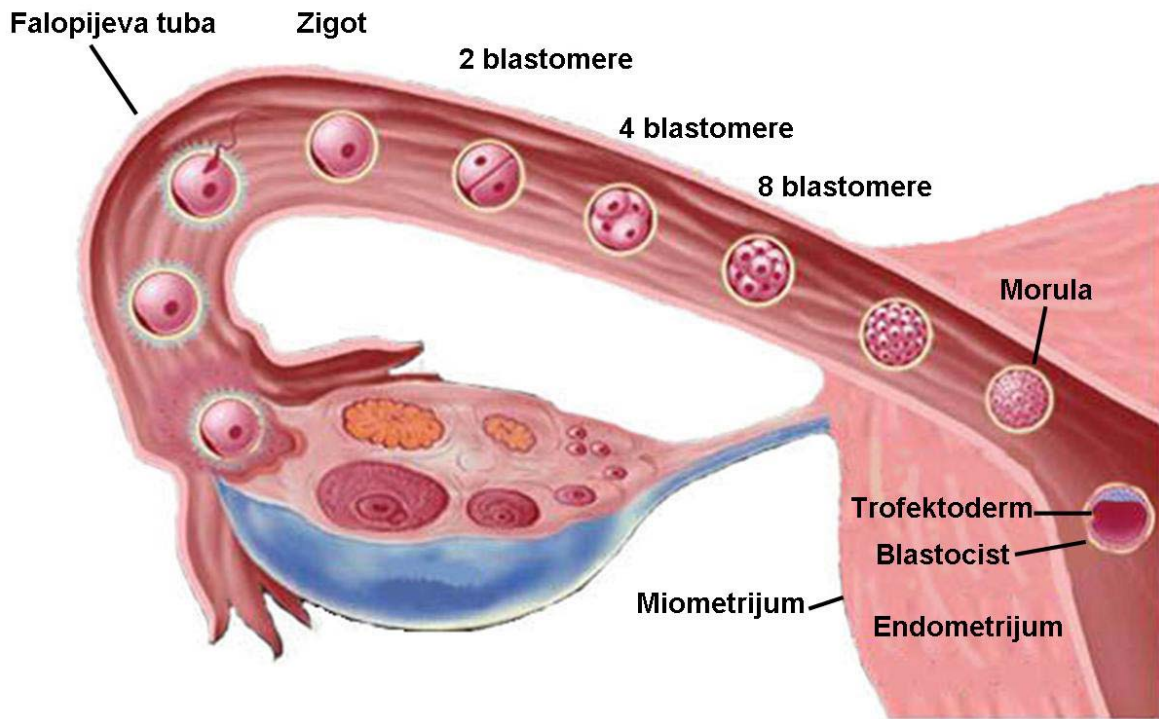
kontakta sa kapsularnom deciduom degenerišu na kraju trećeg meseca trudnoće obrazujući *chorion leave* (glatki horion; Benirschke i Kaufmann, 2000).

Za uspešno formiranje funkcionalno aktivne placente potrebna je visoko usaglašena kontrola vaskularizacije, angiogeneze i trofoblastne funkcije, što je rezultat delovanja velikog broja faktora posredstvom autokrinih i parakrinih mehanizama regulacije (Lunghi i sar., 2007).

1.2. Stadijumi implantacije embriona čoveka

1.2.1. Preimplantaciona faza

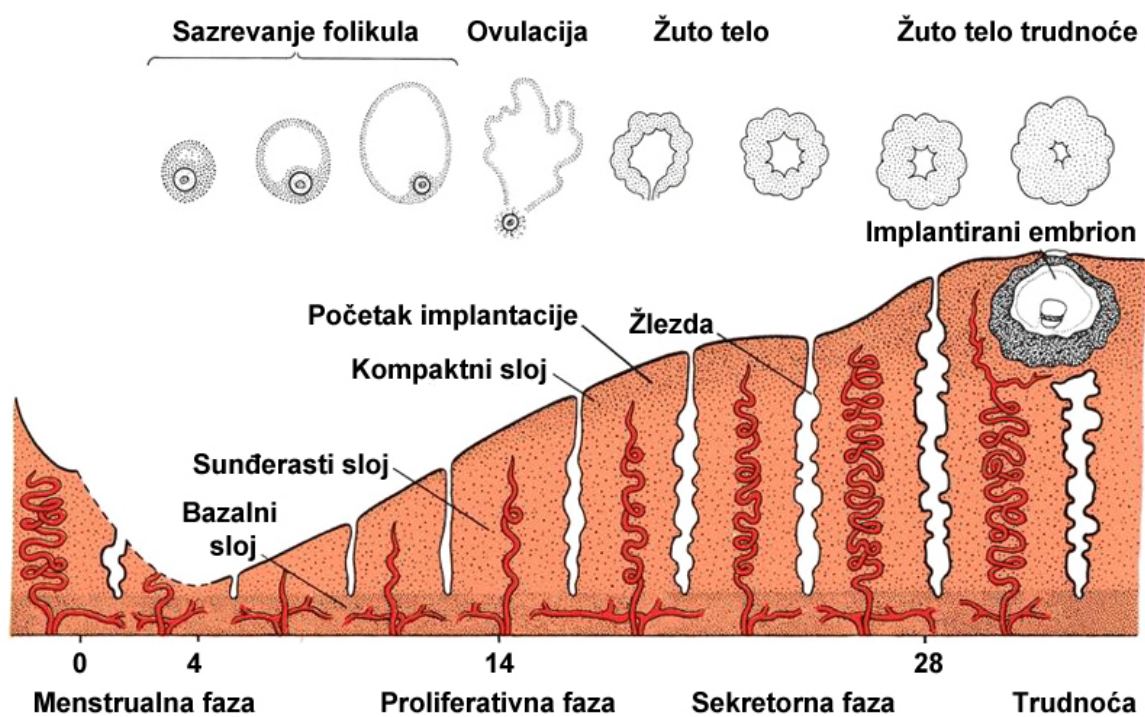
Oplođenje jajne ćelije kod čoveka odvija se u ampularnom delu jajnika, a kao rezultat ovog procesa nastaje zigot. U prva 24 časa nakon oplođenja dolazi do brazdanja zigota na identične ćelije, blastomere. Proces blastomerizacije odvija se tokom kretanja zigota duž jajovoda ka materici. Kao rezultat blastomerizacije nastaje morula koja dospeva u endometrijum (**Slika 2**). Petog dana razvića morula počinje da apsorbuje tečnost i povećanjem količine tečnosti između ćelija nastaje šupljina, blastocel, a od morule nastaje šuplja lopta, blastocista. U ovom stadijumu razlikujemo trofoblast koji čini zid blastociste, i od kojeg će nastati placenta i horion, i embrioblast koji predstavlja grupu ćelija u unutrašnjosti blastociste koja naleže na jedan pol i od kojeg će nastati embrion, amnion, alantois i žumančana kesa (Murray i sar., 1999; Norwitz i sar., 2001).



Slika 2. Rani stadijumi razvića od oplodjenja do formiranja blastociste (Red-Horse i sar., 2004).

U toku preimplantacione faze razvića dolazi do niza promena u endometriju pod uticajem hormona jajnika, estrogena i progesterona (Critchley i Healy, 1998). Za vreme proliferativne faze menstrualnog ciklusa, koja obuhvata period od četvrtog dana menstruacije do ovulacije, počinje ćelijska regeneracija u žlezdanom i stromalnom odeljku endometrija pod uticajem estrogena koji luče granulozne ćelije rastućeg folikula (**Slika 3**). Ovaj period karakteriše rast endometrija. Nakon ovulacije, započinje sekretorna faza menstrualnog ciklusa koju reguliše progesteron poreklom iz žutog tela (*corpus luteum*). U toku ove faze menstrualnog ciklusa veoma je izražena sekretorna aktivnost žlezda endometrija, a dolazi i do promena u stromalnom odeljku endometrija. Na početku sekretorne faze ne može doći do implantacije blastociste zbog nesprijetnosti epitela endometrija, iako je embrion već sposoban za implantaciju (Aplin, 2000; Denker, 1990). Sredinom sekretorne faze epitel endometrija podleže promenama, i u toku jednog kratkog vremenskog perioda - receptivne faze, u stanju je da pričvrsti blastocistu. Ta se faza

naziva "prozor implantacije", tj. receptivnost, i pod kontrolom je steroidnih hormona, estrogena i progesterona. Estrogeni proliferativne faze stimulišu proliferaciju i rast uterušnih epitelnih ćelija, dok progesteron dovodi do smanjenja proliferacije epitelnih ćelija, promoviše receptivnost i dalju proliferaciju stromalnih ćelija. Kraj receptivne faze poklapa se sa morfološkom diferencijacijom endometrijalnih fibroblasta u sekretorne, decidualne ćelije (Brosens i Gellersen, 2006).



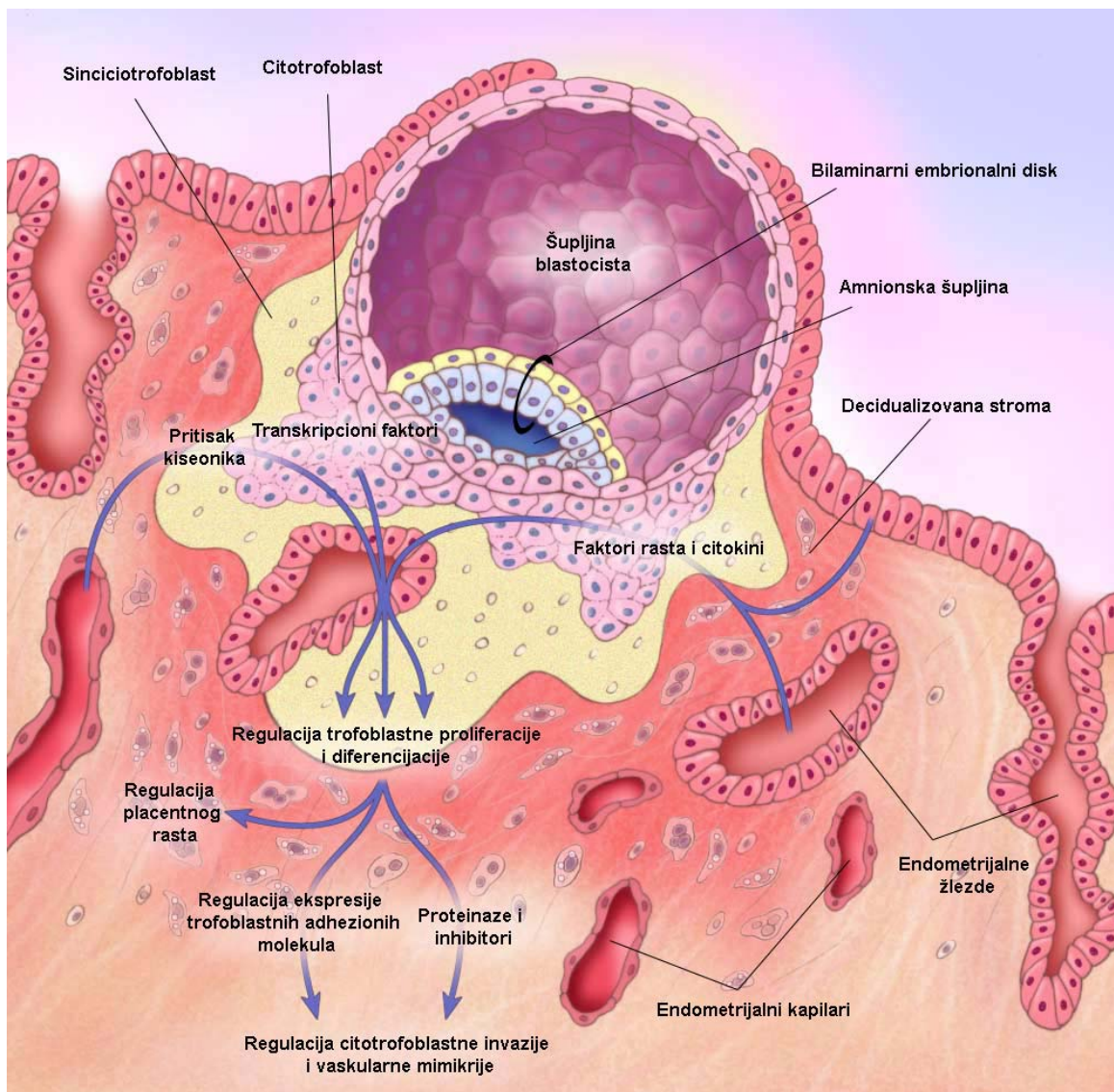
Slika 3. Promene u endometrijumu tokom menstrualnog ciklusa i rane trudnoće (Sadler, 2009).

U ciklusu u kom nije došlo do začeća, nivoi estrogena i progesterona naglo opadaju i dolazi do odbacivanja funkcionalnog sloja endometrijuma, kojeg čine kompaktni i sunderasti sloj (Finn, 1994). U slučaju da je došlo do začeća, ishod će zavisiti od uspešnosti uspostavljanja bliskog kontakta trofektoderma blastociste i ćelija uterusa majke.

1.2.2. Implantacija i placentacija

Implantacija blastociste je proces koji predstavlja interakciju između trofoblastnih ćelija i endometrijuma. Sam proces započinje adhezijom apikalnih plazma membrana trofoblasta i luminalnog epitela endometrijuma, što je opisano kao paradoks u ćelijskoj biologiji, jer je poznato da su apikalne membrane epitela neadhezivne (Denker, 1990). Adhezivnost apikalnih membrana trofoblasta i endometrijuma kratko traje tokom "prozora implantacije" (Psychoyos, 1988). Smatra se da "prozor implantacije" traje od 20. do 24. dana menstrualnog ciklusa (Salamonsen i sar., 2003). U ovom periodu mora doći do sinhronizacije u fazi razvića blastociste kada je ona sposobna za implantaciju sa receptivnom fazom endometrijuma. Izvan ovog perioda apikalna površina epitela je pokrivena tankim glikokaliksom koji se sastoji uglavnom od mucina, posebno MUC1, koji predstavlja transmembranski glikoprotein koji sprečava adheziju blastociste za endometrijum (Hey i Aplin, 1996; Thathiah i sar., 2004).

Proces implantacije započinje šest do sedam dana nakon oplodjenja i odvija se u tri etape (Norwitz i sar., 2001; Vigano i sar., 2003). Apozicija predstavlja inicijalnu, ali nestabilnu, adheziju blastociste za zid uterusa. U ovoj etapi pinopode koje predstavljaju prstolika ispupčenja na apikalnom delu epitela uterusa stupaju u kontakt sa mikrovilima na apikalnom delu trofoblasta blastociste (Lopata i sar., 2002). U sledećem koraku dolazi do stabilne adhezije pri čemu je povećan fizički kontakt između blastociste i epitela uterusa. Poslednja etapa je invazija, koja počinje prodiranjem sinciciotrofoblasta kroz epitel uterusa. Sincicijalni trofoblast prodire između epitelnih ćelija endometrijuma, razgrađuje bazalnu membranu i omogućava blastocisti da uroni u stromu uterusa (**Slika 4**).



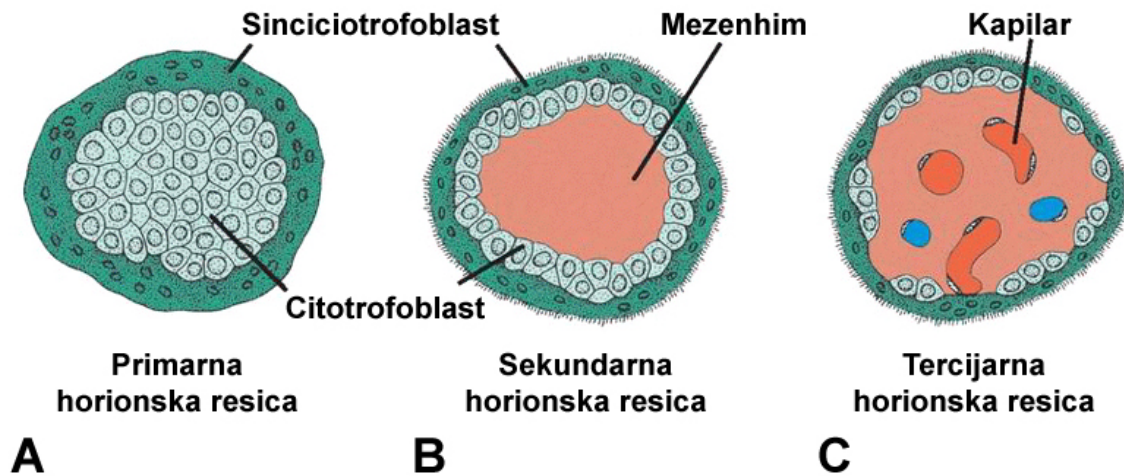
Slika 4. Implantacija embriona 9 – 10 dana nakon začeća (Norwitz i sar., 2001).

Značajnu ulogu u kontroli implantacije blastociste imaju endometrijalni hemokini i citokini. Hemokini su odgovorni za migraciju leukocita do decidue gde prouzrokuju vrstu inflamatornog stanja koje potiče od više izvora. Proces decidualizacije karakteriše interakcija decidualnih NK ćelija (engl. natural killers) sa ćelijama invazivnog trofoblasta, koje ispoljavaju nepolimorfnu HLA I klasu antigena (Pijnenborg, 2002). Zatim, pod uticajem različitih agenasa dolazi do regrutovanja i aktivacije makrofaga, granulocita i dendritičnih ćelija. Ove ćelije imaju imunoregulatornu ulogu i ulogu u tkivnom

remodelovanju obezbeđujući endometrijalnu receptivnost za implantaciju embriona. Transformišući faktor rasta β (TGF- β) i prostaglandini (PG) doprinose povećanju produkcije citokina i vaskularne propustljivosti što je bitno za implantaciju jer favorizuje privlačenje blastociste i adheziju za endometrijum (Saito, 2001). Takođe, hemokini interaguju sa receptorima spregnutim sa proteinom G indukujući strukturne promene integrina koje omogućavaju adheziju blastociste za decidualizovan endometrijum (Bokoch, 1995). Smatra se da su u proces implantacije uključeni različiti adhezioni molekuli, kao što su selektini, integrini i trofini, ispoljeni na trofoblastnim ćelijama i epitelu uterusa (Aplin i Kimber, 2004).

Sa progresijom invazije, sve veća površina trofoblasta dolazi u kontakt sa tkivom uterusa. Osmog dana nakon začeća, pojavljuju se male intersticijalne vakuole u sincicijalnoj masi. Ove vakuole se uvećavaju i formiraju lakune. Dvanaestog dana nakon oplodjenja, blastocista je duboko implantirana u stromu uterusa, a susedne lakune se spajaju i unutar sinciciotrofoblasta se obrazuje lakunarna mreža (Benirschke i Kaufmann, 2000). Na mestu na kome je došlo do prekida epitela lumena endometrijuma dolazi do brze reepitelizacije (Loke i King, 1995). Na ovom stupnju, cela površina blastociste je prekrivena sinciciotrofoblastom (Benirschke i Kaufmann, 2000). Od trinaestog do dvadesetosmog dana razvića traje sledeća faza koja se naziva rani vilusni stadijum razvića. U toku ove faze dolazi do formiranja primarnih resica. Citotrofoblastne ćelije primarne horionske ploče proliferišu i vrše invaziju trabekula. Ovi trofoblastni izdanci, koji probijaju primitivni sincicijum, predstavljaju primarne resice izgrađene od spoljašnjeg sloja sinciciotrofoblasta i citotrofoblasta, a lakunarni sistem postaje intervalusni prostor. Od 15. dana razvića, pojavljuju se citotrofoblastni ćelijski stubovi, koji nastaju proliferacijom citotrofoblasta na vrhovima primarnih resica. Sa nastavkom proliferacije ovih ćelija, ćelijski stubovi se bočno šire i međusobno spajaju, tako da se formira citotrofoblastna ljuska. Za to vreme, mezenhimske ćelije vrše invaziju primarnih vilusa transformišući ih u sekundarne horionske resice koje se sastoje od spoljašnjeg sloja sinciciotrofoblasta, unutrašnjeg sloja citotrofoblasta i centralnog dela kojeg čini vezivno tkivo. Sekundarne resice počinju da se granaju, što predstavlja prvi stadijum nastanka vilusnih stabala. Između

18. i 20. dana nakon oplodjenja primećuju se prvi fetalni kapilari u mezenhimu, koji se diferenciraju od pojedinih mezenhimskih ćelija. Pojava ovih kapilara u vilusnoj stromi znak je razvoja tercijarne resice (**Slika 5**).

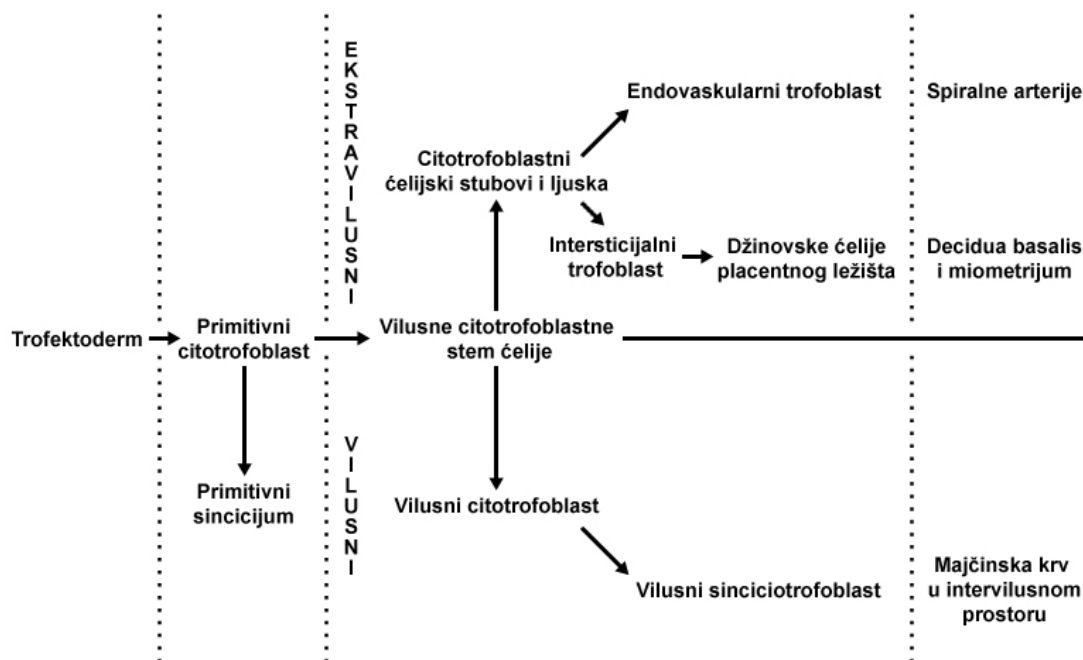


Slika 5. Razviće horionskih resica. Shematski prikaz primarne (A), sekundarne (B), i tercijarne (C) horionske resice (Sadler, 2009).

U plivajućim resicama, polarizovane citotrofoblastne ćelije naležu na bazalnu membranu koja okružuje mezenhimalno stromalno jezgro koje sadrži fetalne krvne sudove (Boyd i Hamilton, 1970; Benirschke i Kaufmann, 2000). Ove citotrofoblastne ćelije proliferišu, diferenciraju i formiraju spoljašnji sincicijum vilusnog stabla (Muhlhauser i sar., 1993). Plivajuće resice ne dolaze u kontakt sa zidom uterusa, kupaju se u majčinskoj krvi, predstavljajući placentnu barijeru preko koje se odvija razmena kiseonika, hranljivih materija i otpadnih produkata između majke i fetusa.

1.2.3. Diferencijacija trofoblasta

Formiranje plivajućih i sidrećih resica započinje odmah nakon implantacije, tako da citotrofoblastne matične ćelije unutar ovih resica diferenciraju u dva glavna pravca: vilusni (VT) i ekstravilusni trofoblast (EVT) (**Slika 6**).



Slika 6. Diferencijacija trofoblasta na mestu implantacije (Loke i King, 1995).

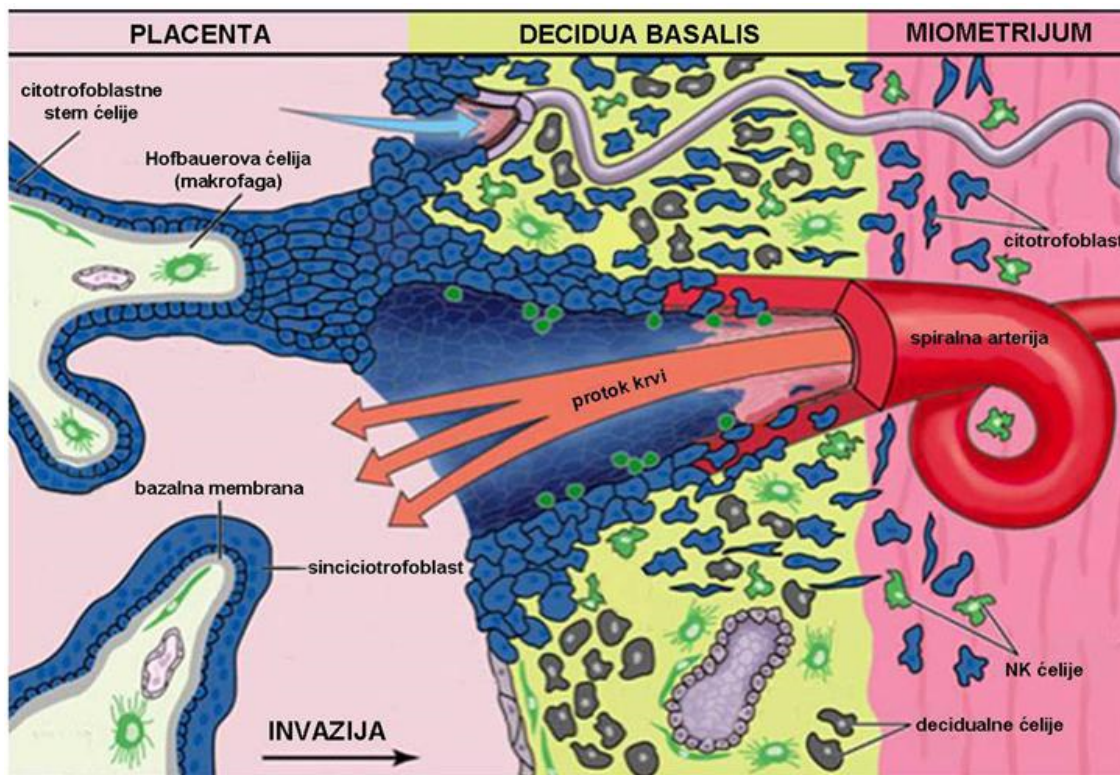
1.2.3.1. Vilusni trofoblast

Kao što je već pomenuto, razviće vilusa počinje u drugoj nedelji trudnoće pojavom citotrofoblastnog izdanka koji probija primitivni sincicijum. Tokom prvog trimestra trudnoće trofoblast vilusa je dvoslojan i sačinjen od sinciotrofoblasta i sloja polarizovanih, visoko proliferativnih citotrofoblastnih - Langerhansovih ćelija, koje naležu na bazalnu membranu. Glavna funkcija vilusnog stabla je prenos hranljivih materija, kiseonika i drugih supstanci od majčinske ka fetalnoj cirkulaciji.

1.2.3.2. Ekstravilusni trofoblast

Trofoblastne ćelije koje ne ulaze u sastav horionskih resica predstavljaju ekstravilusni trofoblast. Ove ćelije vode poreklo od vilusnih citotrofoblastnih matičnih ćelija čijom proliferacijom i diferencijacijom nastaju različite subpopulacije ekstravilusnih trofoblastnih ćelija (Aplin i sar., 2000). Ekstravilusne trofoblastne ćelije ulaze u sastav ćelijskih stubova,

septi i ćelijskih ostrvaca, glatkog horiona, marginalne zone i horionske ploče. Ekstravilusne trofoblastne ćelije se diferenciraju dajući intersticijalne EVT ćelije koje vrše dalju invaziju do miometrijuma, i endovaskularne EVT ćelije koje modifikuju zidove spiralnih arterija (Slika 7).



Slika 7. Diferencijacija trofoblasta u zoni interakcije majke i fetusa (Hoang i sar., 2001).

1.2.3.2.1. Intersticijalni trofoblast

Kako bi ekstravilusne trofoblastne ćelije uspešno ostvarile invaziju uterusa potrebno je da izvrše transformaciju majčinih spiralnih arterija. Ove ćelije su tolerantne na hipoksične uslove i uspešno izbegavaju imunski odgovor majke.

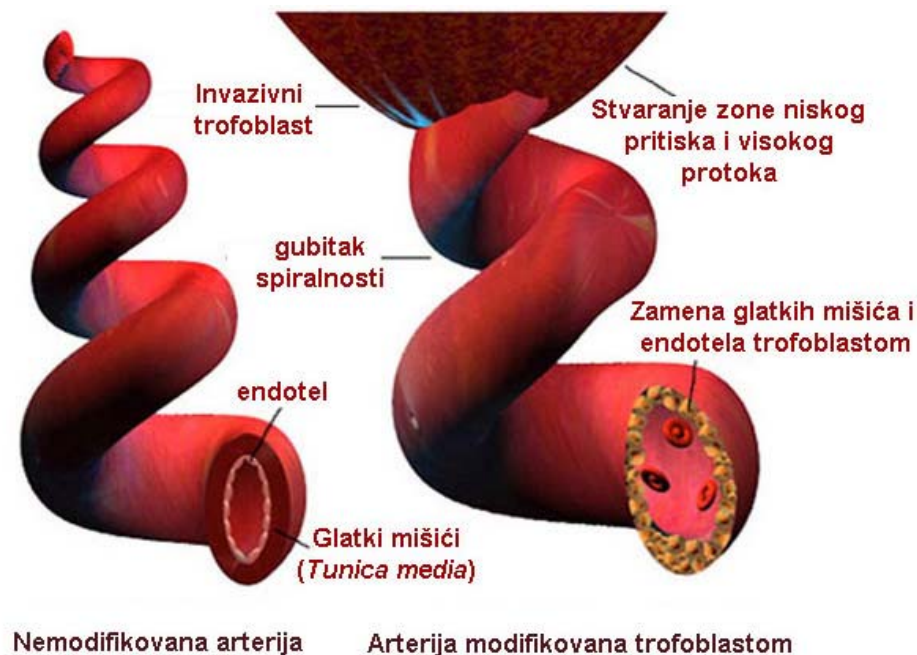
Citotrofoblast sidreće resice proksimalno čine visoko proliferativne ćelije, dok distalno bliže endometrijumu citotrofoblast stiče i migratorne karakteristike. Ovaj prelaz u migratorne EVT ćelije je posredovan kontaktom vrha vilusa prvog trimestra sa decidualnim

vanćelijskim matriksom (engl. extracellular matrix - ECM). Adhezija za ECM stimuliše proliferaciju citotrofoblasta i diferencijaciju duž ekstravilusnog puta (Aplin i sar., 2000). Citotrofoblastne ćelije vrše invaziju uterusa sve do endometrijalno-miometrijalne granice. Invazivne ćelije stiču izmenjenu morfologiju i ispoljavaju izmenjen repertoar adhezivnih molekula (Aplin i sar., 2000).

Do početka drugog trimestra, intersticijalne EVT ćelije prodiru do prve trećine miometrijuma i diferenciraju u okrugle, višejedarne džinovske ćelije placentnog ležišta, koje se smatraju krajnjom tačkom puta diferencijacije ekstravilusnog trofoblasta. Kako ove ćelije gube sposobnost migracije i invazije, njihovo formiranje verovatno predstavlja mehanizam koji sprečava dublje prodiranje u zid uterusa (Loke i King, 1995). Invazija uterusa dešava se u dva talasa, prvi put u prvom trimestru i drugi put u drugom trimestru i završava se oko 18. nedelje gestacije (Pijnenborg i sar., 1980). Glavni cilj invazije uterusa je remodelovanje zidova spiralnih arterija kako bi se omogućio intenzivan dotok krvi u intervulusni prostor.

1.2.3.2.2. Endovaskularni trofoblast

Deo EVT ćelija migrira lateralno od sidrećih resica. Ove ćelije u velikom broju naležu na otvore spiralnih arterija formirajući čep od endovaskularnih trofoblastnih ćelija. Od proksimalnog dela čepa EVT ćelije migriraju retrogradno niz lumen spiralnih arterija, pri čemu dolazi do destrukcije glatko-mišićnih ćelija, verovatno procesom apoptoze i njihove zamene fibrinoidom u kome se nalaze ćelije endovaskularnog trofoblasta. Nakon ovih promena spiralne arterije su veoma proširene i potpuno neosetljive na vazokonstriktorne agense čime su osposobljene za provođenje velike količine krvi u intervulusni prostor, što je potrebno za rast fetusa sve do porođaja (Pijnenborg i sar., 1980; Hustin i Schaaps, 1987; Burton i sar., 1999) (**Slika 8**).



Slika 8. Shematski prikaz promene spiralnih arterija endometrijuma (Pijnenborg i sar., 2006).

Inicijalno remodelovanje krvnih sudova je ograničeno na decidualne krvne sudove, dok se remodelovanje krvnih sudova miometrijuma dešava od 14. do 18. nedelje gestacije (Pijnenborg i sar., 1980).

Citotrofoblastne ćelije koje vrše transformaciju spiralnih arterija menjaju repertoar adhezivnih molekula ispoljavajući tipično vaskularni fenotip. Ove ćelije počinju da ispoljavaju VE-kadherin, integrin α_4 i druge adhezivne molekule tipične za ćelije endotela (Zhou i sar., 1997).

Razvoj placente i rana trudnoća odvijaju se u hipoksičnim uslovima. Hipoksični milje u kome se embrion razvija mogao bi da služi kao zaštita fetalnih tkiva od štetnog dejstva reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. Reactive Oxygen Species - ROS) za vreme embriogeneze. Od 8. do 10. nedelje gestacije parcijalni pritisak kiseonika u placenti je značajno niži nego u endometrijumu, što je posledica ograničenog dotoka oksigenisane krvi majke u intervalusni prostor. Od 12. do 13. nedelje parcijalni pritisak kiseonika je u porastu,

i nestaje trofoblastni čep spiralnih arterija (Rodesch i sar., 1992). Smatra se da hipoksija menja balans između proliferacije i diferencijacije u korist prvog procesa (Tominaga i Page, 1996). *In vivo*, proliferacija vilusnih citotrofoblastnih ćelija je povećana između 6. i 10. nedelje gestacije, a značajno se smanjuje između 10. i 12. nedelje, kada je placenta izložena uticaju krvi majke. Smatra se da se utero-placentna cirkulacija uspostavlja 12. nedelje trudnoće (Jauniaux i sar., 2001). Genbačev i sar. (1996) su pokazali da CT ćelije u hipoksičnim uslovima *in vitro* ispoljavaju samo markere rane diferencijacije, kao što su α_5 , β_1 i fibronektin, dok je ekspresija α_1 inhibirana, što se može povezati sa smanjenom invazivnošću ovih ćelija. Sa druge strane, postoje i suprotna mišljenja po kojima hipoksija indukuje ekstravilusnu trofoblastnu diferencijaciju u invazivni fenotip (James i sar., 2006).

Neadekvatna i plitka trofoblastna invazija krvnih sudova majke dovodi do patoloških poremećaja kao što su preeklampsija i ograničeni fetalni rast, dok sa druge strane prekomerna trofoblastna invazija duboko u miometrijum i njegove krvne sudove dovodi do bolesti kao što je *placenta accreta*.

1.3. Čelijski adhezioni molekuli i implantacija

Trofoblastna invazija je precizno regulisana i vremenski i prostorno (Graham i Lala, 1991). Čelije trofoblasta koje vrše invaziju zida uterusa podležu epitelno-mezenhimske promeni repertoara adhezivnih molekula koja se odvija u medijalnom i distalnom delu ćelijskog stuba i epitelno-endotelnoj promeni fenotipa u spiralnim arterijama (Vićovac i Aplin, 1996; Zhou i sar., 1997). Čelijske komponente koje su značajne za proces invazije EVT ćelija su adhezivni molekuli (integrini i dr.), molekuli vanćelijskog matriksa (laminin, fibronektin, kolagen i dr.), kao i brojni proteolitički enzimi koji razgrađuju komponente ECM (metaloproteinaze i dr.; Damsky i sar., 1994).

Integrini su heterodimerni membranski glikoproteini sastavljeni od α i β subjedinica. Oni vezuju različite komponente vanćelijskog matriksa i na taj način posreduju u adheziji, migraciji i invaziji različitih tipova ćelija (Burghardt i sar., 2002). Vezivanje za ligande vanćelijskog matriksa dovodi do aktivacije integrinskih receptora, reorganizacije

цитоскелета кроз vezivanje aktinskih filamenata за цитоплазматске репове интегринских субјединица и активације различитих сигналних путева укључених у ћелијску миграцију, пролиферацију и диференцијацију (Juliano и Haskill, 1993; Lafrenie и Yamada, 1996).

Ћелије трофобласта модулишу свој интегрински репертоар током инвазије утерусне стrome, тако да постоји разлика у експресији интегрина у инвазивним и неинвазивним ћелијама (Bowen и Hunt, 2000). Вилусне цитотрофобластне ћелије испољавају интегрин $\alpha_6\beta_4$ којим ове ћелије везују laminin у базалној мембрани (Aplin, 1993). Проксималне слојеве цитотрофобласта сидреће ресице карактерише смањена експресија $\alpha_6\beta_4$ и постепено повећање експресије интегрина $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_6\beta_1$ до дисталних слојева stubova који почињу да експримирају интегрин $\alpha_1\beta_1$ (Zhou и sar., 1997). Интегрин $\alpha_5\beta_1$ је рецeптор за fibronectin, а $\alpha_1\beta_1$ је рецeптор за laminin и колaген типа I и IV. Интегрини α_v субфамилије могу такође везивати fibronectin, а испољени су у екстравилусном цитотрофобласту (Zhou и sar., 1997). Промена у експресији интегрина од $\alpha_6\beta_4$ до $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_1\beta_1$ и α_v интегрина повезана је са променом од пролиферативног ка инвазивном фенотипу EVT ћелија и назива се интегринско прекoпчаванје. Irving и Lala (1995) су показали да блокирање $\alpha_5\beta_1$ и $\alpha_v\beta_3$ интегрина специфичним антителима инхибира трофобластну миграцију *in vitro*, док су Librach и sar. (1991) дошли до супротних закључака. Антитело које блокира $\alpha_1\beta_1$ интегрин смањило је трофобластну инвазију, док је антитело које блокира $\alpha_5\beta_1$ интегрин стимулисало. Сматра се да је код прееклампсије смањена трофобластна инвазија повезана са абнормалним интегринским прекoпчаванјем (Zhou и sar., 1993; Damsky и sar., 1993). Код прееклампсије коју карактерише смањена инвазивност EVT очувана је експресија $\alpha_6\beta_4$ интегрина док је у недovolјној мери испољен интегрин $\alpha_1\beta_1$. Irving и Lala (1994; 1995) су показали да инсулину-сличан фактор раста везујући протеин-1 (IGFBP-1) пореклом из decidue везује $\alpha_5\beta_1$ и тако блокира везивање интегрина за друге лиганде промовишући инвазију. Сматра се да баланс између $\alpha_5\beta_1$ и $\alpha_1\beta_1$ може бити значајан за регулацију трофобластне инвазије, док дисбаланс води до недovolјне инвазије, као у патолошком поремећају, прееклампсији (Damsky и sar., 1993). Такође, показано је да $\alpha_v\beta_3/\beta_5$ и β_1 интегрини посредују у адheziji цитотрофобластних ћелија за ендотелне ћелије *in vitro*, сугеришући да би они могли олакшати адheziju ендoваскуларног трофобласта и миграцију унутар артерија утеруса (Thirkill и Douglas, 1999). Цитотрофобласт испољава и интегрин α_4 који везује

VCAM-1 (vaskularni ćelijski adhezioni molekul-1), ukazujući da integrin $\alpha_4\beta_1$ može posredovati u homotipskim interakcijama citotrofoblasta, kao i u heterotipskim interakcijama sa endotelom u procesu endovaskularne invazije (Zhou i sar., 1997). Dubernard i sar. (2005) su pokazali da istovremena ekspresija α_1 , α_3 , α_5 i α_6 integrina može biti značajna za migraciju EVT ćelija.

Pored promene ekspresije integrina, na ćelijama invazivnog trofoblasta menja se ekspresija i drugih adhezivnih molekula. Tako se smanjuje ekspresija E-kadherina sa sticanjem invazivnog fenotipa, dok se ekspresija VE-kadherina povećava (Benirschke i Kaufmann, 2000). Adekvatna prostorno-vremenska ekspresija adhezivnih molekula, kao i njihova interakcija sa komponentama vanćelijskog matriksa od značaja je za diferencijaciju i invaziju ekstravilusnih trofoblastnih ćelija (Zhou u sar., 1997).

1.4. Uloga galektina-1 u trofoblastnoj invaziji

Galektini su članovi velike familije lektina koji imaju zajedničku, konzervisanu sekvencu od 130 aminokiselina, koja predstavlja CRD domen (engl. carbohydrate recognition domain - CRD) odgovoran za vezivanje β – galaktozida (Leffler i sar., 2004). Do sada je kod čoveka detektovano trinaest različitih galektina. Biološka funkcija pokazana je za različite galektine *in vitro* i *in vivo*. Oni su uključeni u različite fiziološke i patološke procese kao što su proliferacija, apoptoza, diferencijacija, adhezija, migracija, organizacija vanćelijskog matriksa i metastaze tumora (van den Brule i sar., 2004; Lefranc i sar., 2005).

Galektin-1 (gal-1) postoji kao monomer (~14,5 kDa) i ne-kovalentni homodimer (~29 kDa) koji ima jedan ili dva CRD domena (Lopez-Lucendo i sar., 2004). Gal-1 ima različite biološke funkcije, uključen je u ćelijsku adheziju, migraciju, invaziju, apoptozu i remodelovanje ECM (Hsu i Liu, 2004; Kolundžić i sar., 2011).

Gal-1 je takođe prisutan u endometrijumu i njegova ekspresija je zavisna od faze menstrualnog ciklusa, tako da je gal-1 umereno ispoljen u proliferativnoj i ranoj/srednjoj sekretornoj fazi, dok je značajno povećan u kasnoj sekretornoj fazi i u decidualnim

stromalnim ćelijama (von Wolff i sar., 2005). Pokazano je da gal-1 moduliše ćelijsku adheziju vezujući se za odgovarajuće glikoproteine (Rabinovich, 1999; Liu, 2000). Gal-1 je u početku sintetisan u trofektodermu blastociste neposredno pre implantacije, što ukazuje na moguću ulogu ovog galektina u pričvršćivanju embriona za zid uterusa (Poirier i sar., 1992). Prisustvo gal-1 detektovano je i u normalnoj placenti prvog trimestra (Maquoi i sar., 1997; Vićovac i sar., 1998). Gal-1 je ispoljen u citotrofoblastnim ćelijama u medijalnom i distalnom delu ćelijskih stubova. Takođe, pokazano je da je gal-1 prisutan u znatno manjoj meri ili je odsutan u invazivnim, intersticijalnim migratornim citotrofoblastnim ćelijama, što može da sugeriše da je ekspresija ovog proteina zavisna od stadijuma diferencijacije i da bi smanjenje ekspresije ovog proteina moglo biti regulisano na autokrini ili parakrini način (Vićovac i sar., 1998). Ekspresija gal-1 u normalnoj placenti razlikuje se od ekspresije ovog molekula u patološkim stanjima. Tako je pokazano da u preeklampsiji ćelije ekstravilusnog trofoblasta povećano ekspimiraju gal-1 u odnosu na normalnu placentu (Jeschke i sar., 2007).

Smatra se da galektini ispoljeni na decidualnim i trofoblastnim ćelijama, zajedno sa komponentama ECM, mogu uticati na trofoblast modulišući: a) homotipsku adheziju trofoblasta (u vilusnom citotrofoblastnom sloju i proksimanom delu ćelijskog stuba), b) interakcije između trofoblastnih i decidualnih ćelija sa za njih vezanim molekulima ECM i c) trofoblastnu adheziju za decidualni ECM (Maquoi i sar., 1997).

1.5. Matriksne metaloproteinaze

Trofoblastna invazija između ostalog dovodi do razgradnje i remodelovanja endometrijalnog vanćelijskog matriksa (Graham i Lala, 1991; Bischof i Martelli, 1992). Različite proteaze, njihovi aktivatori i inhibitori su uključeni u ovaj proces. Među najbolje proučenim proteazama su matriksne metaloproteinaze (MMP), koje sintetišu trofoblastne ćelije (Bischof i sar., 1991). Matriksne metaloproteinaze su endopeptidaze koje sadrže cink i koje su sposobne da razgrađuju sve komponente vanćelijskog matriksa. Dele se u pet klasa: kolagenaze, želatinaze, stromelizini, membranski-tip i neklasifikovane

metaloproteinaze (Hidalgo i Eckhardt, 2001). Stvaraju se kao proenzimi i za njihovu aktivaciju potrebno je uklanjanje propeptidnog domena. MMP-1 je proteaza prisutna u endometriju i ona razgrađuje kolagen tipa I i III. Rane invazivne ćelije ne ispoljavaju ovu proteazu, ali kako invazija odmiče, ćelije na većoj dubini počinju da je ekspimiraju. Posebno je ispoljena u endovaskularnom trofoblastu i u decidualnim ćelijama. MMP-2 razgrađuje uglavnom kolagen tipa IV, koji je veoma zastupljen protein ECM decidue, i ispoljena je u ekstravilusnom invazivnom trofoblastu, dok je nema u proliferativnom trofoblastu (Autio- Harmainen i sar., 1992). MMP-2 se luči već na stadijumu blastociste (Puistola i sar., 1989). MMP-3 razgrađuje fibronektin, laminin, različite tipove kolagena. Ovu metaloproteinazu ispoljavaju trofoblastne ćelije u kasnijim stadijumima invazije. MMP-7 razgrađuje fibronektin, kolagen, laminin i proteoglikane. Ekspresija MMP-7 je povećana u preeklampsiji (Vettraino i sar., 1996). MMP-9 uglavnom razgrađuje kolagen tipa IV, glavnu komponentu bazalne membrane, i po tome je slična sa MMP-2, međutim, njihova zastupljenost se razlikuje. MMP-9 je prisutna u proksimalnom delu ekstravilusnih trofoblastnih ćelija. Njena ekspresija se smanjuje u ranom invazivnom stadijumu, a onda ponovo povećava u intersticijalnim invazivnim ćelijama (Polette i sar., 1994). Takođe, ekspresija ove metaloproteinaze se smanjuje sa odmicanjem gestacije (Librach i sar., 1991). Pokazano je da je MMP-2 glavna želatinaza u ranom prvom trimestru (od 6. do 8. nedelje gestacije), a MMP-9 od 9. do 12. nedelje gestacije (Staun-Ram i sar., 2004). Želatinaze MMP-2 i -9 mogu uticati i na aktivaciju TGF- β , a mogu i modulisati funkciju angiogenih faktora, endotelina-1 i angiostatina (Yu i Stamenković, 2000). MMP-11 razgrađuje laminin, kolagen tipa IV, i proteoglikane. Ispoljena je samo u invazivnom fenotipu EVT ćelija i njena ekspresija se smanjuje kako gestacija odmiče (Polette i sar., 1994; Maquoi i sar., 1995). MT-MMP (membranski tip matriksnih metaloproteinaza) aktivira MMP-2 i ispoljena je na proliferativnim i invazivnim trofoblastnim ćelijama u prvom i trećem trimestru (Nawrocki i sar., 1996). Aktivnost matriksnih metaloproteinaza je regulisana njihovim tkivnim inhibitorima (TIMP). Produkuju ih trofoblast i decidua u toku gestacije (Niu i sar., 2000). U humanojoj placenti je pokazano da je TIMP-1 inhibitor svih poznatih metaloproteinaza, dok TIMP-2 prvenstveno deluje na MMP-2. U decidui TIMP-2 je stalno ispoljen u toku trudnoće, dok TIMP-1 ima povećanu aktivnost ka terminu porođaja (Polette

i sar., 1994). TIMP-1 i TIMP-3, a u manjem opsegu i TIMP-2 su detektovani u preimplantacionom embrionu kod čoveka.

In vitro studije su pokazale da su uspešna implantacija i placentacija rezultat balansa između sekrecije metaloproteinaza od strane trofoblasta i njihove inhibicije tkivnim inhibitorima metaloproteinaza (Niu i sar., 2000; Dey i sar., 2004). Faktori rasta i citokini koji utiču na trofoblastnu invaziju mogu povećati ili smanjiti aktivnost MMP i/ili njihovih inhibitora. TGF- β kojeg proizvodi decidua i u manjoj meri i trofoblast inhibira trofoblastnu invaziju, jer povećava produkciju TIMP-1 i smanjuje migratornu sposobnost ovih ćelija (Graham i Lala, 1991; Irving i Lala, 1995). Librach i sar. (1991) su pokazali da TIMP-1 i TIMP-2 potpuno inhibiraju invaziju citotrofoblastnih ćelija čoveka *in vitro*.

1.6. Decidualizacija

Promene u endometriju tokom kojih se stromalne ćelije endometrija transformišu u metabolički aktivne, sekretujuće, decidualne ćelije označene su terminom decidualizacija. Decidualne ćelije su ovalnog oblika sa dosta masnih kapljica i granula glikogena u citoplazmi, što ukazuje da su slične epitelnim ćelijama i miofibroblastima (Oliver i sar., 1999). Decidualne ćelije proizvode prolaktin, relaksin, renin, IGFBP-1 i specifične proteine vanćelijskog matriksa, kao što su laminin i fibronektin (Salamonsen i sar., 2003). Pored modifikacije endometrijalnih stromalnih ćelija, dolazi i do modifikacije žlezda i krvnih sudova uterusa, kao i sastava populacije imunskih ćelija. Promene u endometriju su ciklične, a nastaju pod uticajem estrogena i progesterona (Critchley i Healy, 1998). *In vitro* studije pokazuju da je proces decidualizacije povezan sa promenama u ekspresiji receptora za steroidne hormone, promenama u remodelovanju vanćelijskog matriksa i citoskeleta, kao i promenama u ekspresiji enzima, faktora rasta i citokina.

Kod čoveka, za razliku od drugih vrsta, proces decidualizacije je nezavisan od prisustva blastociste u uterušnoj šupljini i počinje u drugoj polovini sekretorne faze menstrualnog ciklusa, pod uticajem progesterona (Salamonsen i sar., 2003). Ukoliko dođe do trudnoće decidualizacija se nastavlja i smatra se da je uključena u regulaciju invazije

trofoblasta i formiranje placente sintetišući regulatorne faktor kao što su citokini, metaloproteinaze, integrini i molekuli glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC molekuli). Sa druge strane, i sam trofoblast oslobađa parakrine signale koji modulišu gensku ekspresiju decidualnih stromalnih ćelija (Hess i sar., 2007).

U zidu uterusa prisutni su i različiti tipovi leukocita, kao što su T i B limfociti, makrofagi i NK ćelije. Nakon ovulacije dolazi do upadljivog povećanja broja NK ćelija, koje se fenotipski i funkcionalno razlikuju od NK ćelija u cirkulaciji. Ove ćelije nemaju citolitičku aktivnost i ispoljavaju integrine koji omogućavaju njihovu migraciju i invaziju u decidualni endometrijum (King, 2000). U drugoj polovini trudnoće broj NK ćelija opada i one nestaju na porođaju što sugeriše da učestvuju u ranoj trudnoći kao modulatori implantacije i placentacije, interagujući i sa decidualnim stromalnim ćelijama i sa trofoblastom (Parham, 2004). Preživljavanje ovih ćelija je zavisno od progesterona (Loke i King, 1995).

Za proces decidualizacije je takođe karakteristično smanjenje broja Th1 i povećanje broja Th2 limfocita, na šta utiču progesteron i citokini. Postoji mišljenje da citokini koje proizvode Th2 limfociti štite fetus i trofoblast inhibirajući proliferaciju i citotoksičnost NK ćelija, menjajući produkciju citokina NK ćelija ka Th2 fenotipu, kao i inhibirajući aktivaciju citotoksičnih T limfocita (Saito i Sakai, 2003; Quenby i Farquharson, 2006).

1.6.1. Decidualizacija i prolaktin

Postoje mišljenja da je jedna od značajnijih uloga decidualnog endometrijuma da obezbedi nutritivnu sredinu za razvoj fetusa u toku trudnoće. Pored toga decidua je i mesto produkcije mnogih molekula. Prolaktin je jedan od glavnih proteina koji se sintetiše i sekretuje *in vivo* za vreme procesa decidualizacije (Maslar i Riddick, 1979). U odsustvu trudnoće prolaktin se sintetiše između sredine sekretorne faze i menstruacije. Njegova pojava se poklapa sa pojavom prvih histoloških znakova decidualizacije. U trudnoći, nakon implantacije sekrecija prolaktina od strane decidue se povećava i dostiže maksimum 20-25 nedelje trudnoće nakon čega se smanjuje do porođaja (Wu i sar., 1995).

Decidualni prolaktin se ne razlikuje od prolaktina koji sintetizira hipofiza, po hemijskim, biološkim i imunološkim kriterijumima (Tomita i sar., 1982). Međutim, decidualni RNK transkript za PRL je duži i razlikuje se u 5' netranslatornom regionu (Tomita i sar., 1982; Gellersen i sar., 1989). Usporedna analiza RNK transkripta prolaktina decidualnog i hipofiznog porekla pokazala je angažovanje alternativnog promotorskog regiona transkripcije, što je u skladu sa tkivno-specifičnom regulacijom ekspresije prolaktinskih gena u decidui i hipofizi (Gellersen i sar., 1994). Ekspresija prolaktina u hipofizi je zavisna od transkripcionog faktora Pit-1, koji nije ispoljen u uterusu, a klasični regulatori sekrecije hipofiznog prolaktina (bromokriptin, dopamin) nemaju efekat na ekspresiju prolaktina u decidui (Huang i sar., 1987; Ingraham i sar., 1990; Rhodes i sar., 1994).

Ekspresija prolaktina u decidualnom endometriju je kontrolisana progesteronom. U prisustvu progesterona sekrecija prolaktina raste, a u njegovom odsustvu opada u roku od 2 do 3 dana (Maslar i Ansbacher, 1986). Međutim, pokazano je da, iako je značajan za indukciju i održavanje decidualizacije, progesteron ne indukuje ekspresiju gena za prolaktin direktno. Aktivirani receptori za progesteron ne mogu da indukuju transkripciju aktivacijom promotora za decidualni prolaktin (Gellersen i sar., 1994). Postoje podaci koji ukazuju na to da je indukcija ekspresije decidualnog prolaktina povezana sa signalnim putem cAMP-protein kinaza A (Telgmann i Gellersen, 1998). Brosens i sar. (1999) su pokazali da je cAMP glavni regulator ekspresije prolaktina u decidualizovanom endometriju u kasnoj sekretornoj fazi menstrualnog ciklusa i da cAMP-protein kinazni put može učiniti osjetljivim endometrijalne stromalne ćelije na efekte progesterona (Brosens i sar., 1999). Pokazano je da i drugi faktori, kao što su relaksin i IGF-1, mogu da povećaju ekspresiju prolaktina u dugotrajnim kulturama humanih endometrijalnih stromalnih ćelija (Rosenberg i sar., 1991).

Prolaktin poreklom iz decidualnih stromalnih ćelija endometrija, nakon sekrecije u značajnoj meri dospeva i u amnionsku tečnost, jer se njegova količina povećava u amnionu sa odmicanjem gestacije i dostiže maksimum od 4000 do 6000 ng/ml od 20. do 25. nedelje. Koncentracija PRL u serumu majke i fetusa iznosi od 100 do 300 ng/ml, odnosno 50-100

ng/ml (Ben-Jonathan i sar., 1996). Riddick i sar. (1979) su pokazali da količina PRL koju oslobađaja decidualno tkivo u medijum nakon kultivacije od 24 časa iznosi 196 ng/ml.

Pored toga što luči prolaktin, uterus ispoljava i receptore za prolaktin. Ekspresija receptora je vremenski regulisana kroz menstrualni ciklus. Minimalna ekspresija je detektovana za vreme proliferativne faze menstrualnog ciklusa, a povećana je za vreme srednje do kasne sekretorne faze (Jabbour i sar., 1998; Jones i sar., 1998). U odsustvu trudnoće ekspresija prolaktinskog receptora je detektovana u žlezdanim epitelnim ćelijama, dok je u trudnoći prolaktinski receptor ispoljen u decidui, horionskom citotrofoblastu, epitelu amniona i sinciotrofoblastu placentne (Maaskant i sar., 1996; Jabbour i sar., 1998).

1.7. Prolaktin, hormon rasta, placentni laktogen i trudnoća

Prolaktin, hormon rasta (GH) i placentni laktogen (PL) dele mnoge strukturne i biološke odlike, ali veza između strukturne homologije i bioloških odlika nije potpuno jasna. Postoji 85% sličnosti u peptidnoj sekvenci između GH i PL, dok PRL ima samo 25% sličnosti sa ova dva hormona. Međutim, PL ima veoma slab afinitet vezivanja za receptor hormona rasta, dok sva tri hormona vezuju visokim afinitetom prolaktinski receptor (Lowman i sar., 1991; Goffin i sar., 1996). Takođe, sva tri hormona poseduju između 190 i 200 aminokiselina i molekulsku masu od 22- 23 kDa. Smatra se da geni za PRL, GH i PL imaju zajednički predački gen i da PL primata vodi poreklo od GH loze, a PL ostalih vrsta sisara od PRL loze (Cooke i sar., 1981; Miller i Eberhardt, 1983; Walker i sar., 1991). Postoje velike razlike između broja, strukture i uloge PRL različitih životinjskih vrsta, kao npr. PRL glodara, u odnosu na čoveka i primata (Ben-Jonathan i sar., 1996).

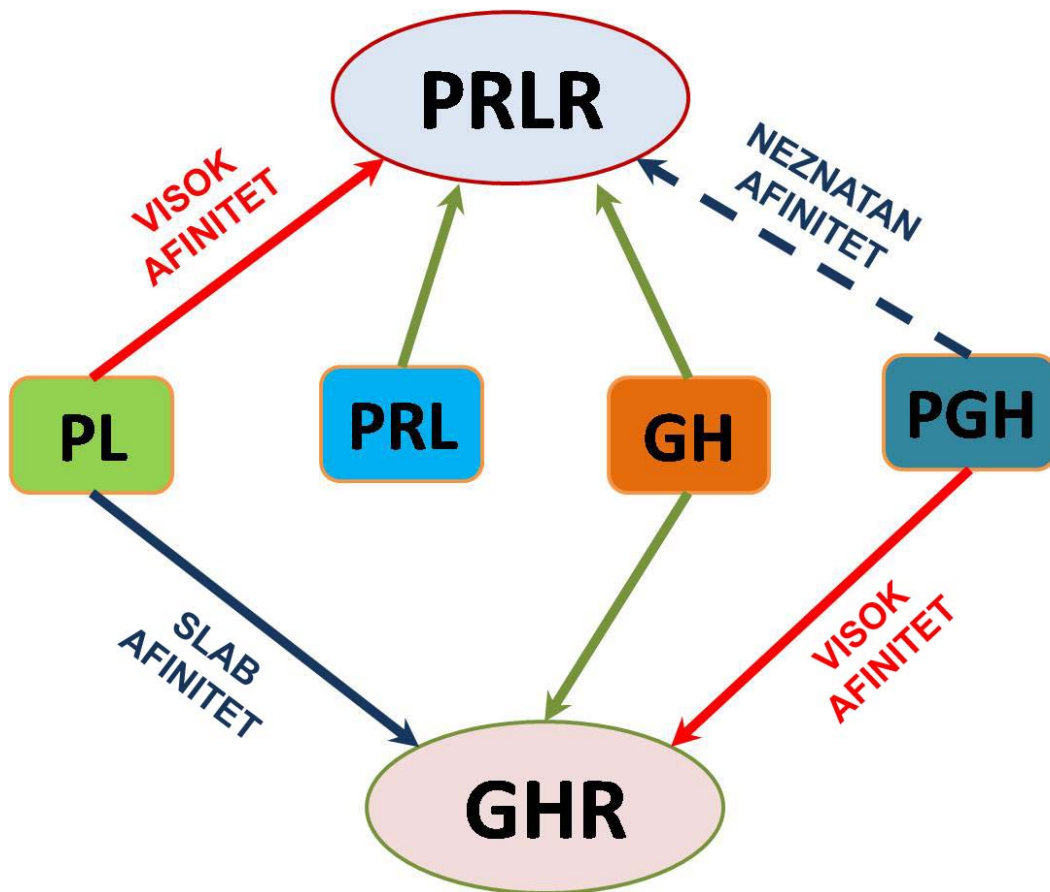
Više od 300 funkcija je opisano za PRL, GH i PL. PRL deluje na reprodukciju, osmoregulaciju, ponašanje, imunoregulaciju, rast i metabolizam itd. (Ben-Jonathan i sar., 1996; Bole-Feysot i sar., 1998; Freeman i sar., 2000). GH utiče na rast, metabolizam proteina, masti i ugljenih hidrata, moduliše funkciju reproduktivnog i imunskog sistema (Waters i sar., 1999; Hull i Harvey, 2001). PL stimuliše razvoj mlečnih žlezda majke, održava *corpus luteum* i produkciju progesterona. PRL i GH produkuje hipofiza, a sintetišu

se i na mestu kontakta majke i fetusa. Za vreme trudnoće, diferencirane stromalne ćelije uterusa, decidualne ćelije, produkuju PRL, dok trofoblastne ćelije, i to sinciciotrofoblast i invazivne EVT ćelije, produkuju hormon rasta i placentni laktogen, koji je ispoljen samo kod sisara (Orwig i sar., 1997).

Prolaktin i hormon rasta mogu delovati kao klasični endokrini modulatori ulazeći u cirkulaciju ili mogu delovati kao citokini ispoljavajući autokrino ili parakrino delovanje. Pokazano je da PRL i GH imaju slično pozicioniran cistein i verovatno sličnu konformaciju. Sintetisani su kao pojedinačni peptidi od oko 30 aminokiselina i različito glikozilovani, a obrazac glikozilacije zavisi od tipa ćelije i samog proteina što utiče na njegovu dostupnost i bioaktivnost (Manzella i sar., 1997). PRL decidualnog porekla je glikozilovan drugačije od PRL kojeg produkuje hipofiza, što može uticati na biološku funkciju ovog molekula (Lee i Markoff, 1986).

Hormon rasta ispoljen u placenti ima molekulsku masu od 22 kDa (placentni hormon rasta, PGH; Igout i sar., 1989). PGH se razlikuje od GH kojeg produkuje hipofiza u 13 aminokiselina, a pored toga poseduje i N-glikozilaciono mesto na poziciji 140-142 (Frankenne i sar., 1990). U ranoj trudnoći GH kojeg produkuje hipofiza je dominantni hormon rasta. Od 10. do 20. nedelje gestacije, pa sve do kraja trudnoće PGH zamenjuje hipofizni GH koji postaje nedetektabilan (Frankenne i sar., 1988). Primećeno je da nakon carskog reza i uklanjanja placentne dolazi do brzog opadanja koncentracije PGH u serumu majke (u roku od jednog sata), što potvrđuje njegovo placentno poreklo (Ericksson i sar., 1989). Inače, PGH nema laktogenu aktivnost, što se smatra da je fiziološki kompenzovano delovanjem PL (Solomon i sar., 2006).

Hormon rasta i prolaktin su strukturno srodni molekuli i vezuju se za strukturno srodne receptore, ali sa različitim afinitetom. Hormon rasta se vezuje za oba receptora, GHR i PRLR, dok placentni hormon rasta ima visok afinitet za GHR, a zanemarljiv afinitet za PRLR. Placentni laktogen ima visok afinitet za PRLR, a slab afinitet za GHR, dok se prolaktin vezuje samo za PRLR (Lowman i sar., 1991; Solomon i sar., 2006) (**Slika 9**).



Slika 9. Shematski prikaz vezivanja članova familije prolaktina za ogovarajuće receptore.

Za vreme trudnoće placenta luči PGH - ligand za GHR, i PL - ligand za prolaktinski receptor. Koncentracija oba liganda se povećava kako trudnoća odmiče. U kasnijim stadijumima trudnoće hipofiza majke značajno smanjuje produkciju GH, dok je produkcija PRL veća nego u negravidnom stanju (Mirlesse i sar., 1993). Kao rezultat toga receptori hormona rasta majke dolaze u kontakt uglavnom sa PGH, dok prolaktinski receptori majke dolaze u kontakt i sa majčanim i sa placentnim ligandom (PRL i PL). PRLR je ispoljen u žlezdanom epitelu i uterusnim NK ćelijama (Jones i sar., 1998; Gubbay i sar., 2002). Za ove receptore vezuje se PL kojeg proizvode EVT ćelije i PRL kojeg proizvode decidualna stroma (Tarrade i sar., 2001). Izneta je zanimljiva hipoteza da je povećana produkcija PL i PRL u trudnoći i njihovo vezivanje za iste receptore (PRLR) moguće samo ako jedan funkcioniše kao agonist, a drugi kao antagonist receptora (Haig, 1996).

1.7.1. Prolaktin

Prolaktin je otkriven pre više od 80 godina (Stricker i Grueter 1928; Riddle i sar., 1933). Označen je kao polipeptidni hormon koga luči hipofiza, a ime je dobio po stimulatornom uticaju na laktaciju. PRL koga proizvode i brojni drugi tipovi ćelija u organizmu, je i citokin na osnovu svojih molekularnih i funkcionalnih karakteristika (Horseman i Yu-Lee, 1994). Hipofizni prolaktin deluje preko klasičnog endokrinog puta. Nakon izlučivanja prenosi se cirkulacijom i deluje na ciljne ćelije na periferiji koje ispoljavaju specifične receptore na membrani. PRL proizvode različiti tipovi ćelija i može delovati kao faktor rasta, neurotransmitter ili imunomodulator. Lokalno produkovan PRL može delovati na susedne ćelije, ispoljavajući parakrino dejstvo ili na ćelije koje ga izlučuju, ispoljavajući autokrino dejstvo.

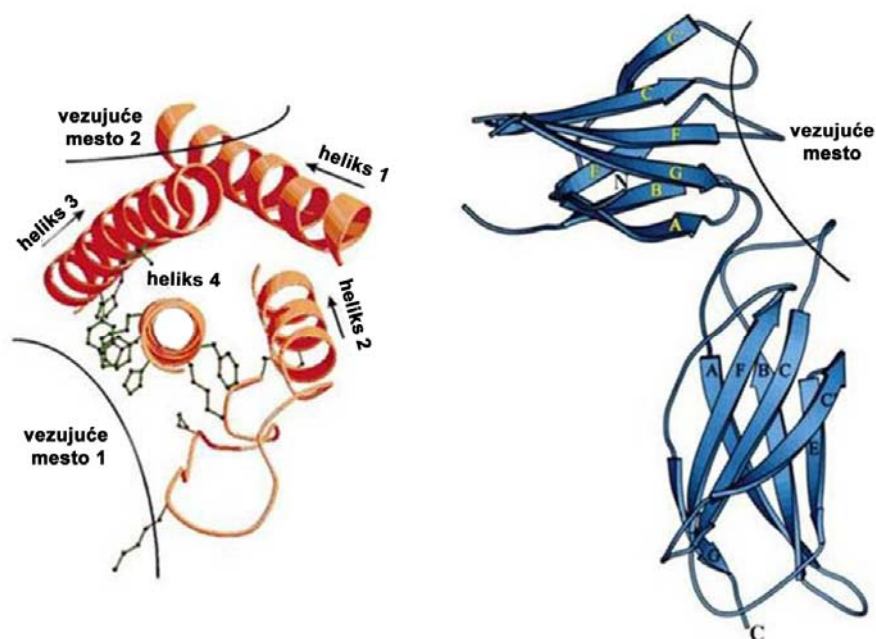
Ekspresija PRL je potvrđena u različitim regionima mozga, decidui, miometriju, suznim žlezdama, timusu, slezini, cirkulišućim limfocitima i limfoidnim ćelijama kostne srži, fibroblastima kože, znojnim žlezdama i tumorima (Ben-Jonathan i sar., 1996). PRL se takođe nalazi i u telesnim tečnostima, kao što su: serum, cerebrospinalna tečnost, amniotska tečnost, suze, mleko, folikularna tečnost i znoj.

1.7.1.1. Struktura prolaktina

Gen koji kodira PRL nalazi se na hromozomu 6 kod čoveka i sastoji se od 5 egzona i 4 introna dužine oko 10 kb (Owerbach i sar., 1981; Truong i sar., 1984; Horseman i Yu-Lee, 1994). Ovaj gen kod ljudi ima dva fizički odvojena promotora koji su odgovorni za tkivno-specifičnu ekspresiju prolaktina (DiMattia i sar., 1990). Decidualni PRL koristi alternativni promotor, lokalizovan oko 6 kb uzvodno u poređenju sa promotorom gena hipofiznog PRL (Gellersen i sar., 1989). Korišćenjem različitog promotorskog regiona može se objasniti različita regulacija gena za PRL između ova dva tkiva.

Kod različitih vrsta kičmenjaka, izuzev riba, PRL se sastoji od 197-199 aminokiselina i sadrži šest cisteina koji formiraju tri intramolekulske disulfidne veze (Cys 4-11, 58-174,

191-199 u humanom PRL) i čine ga četiri α -heliksa (Goffin i sar., 1996) (Slika 10). Primarna struktura prolaktina je visoko konzervirana unutar određene klase organizama, tako da humani PRL ima 74% identičnih aminokiselina sa goveđim PRL (Miller i sar., 1981).



Slika 10. Struktura prolaktina (Bole-Feysot i sar., 1998).

Posttranslacione modifikacije zrele forme PRL uključuju glikozilaciju, fosforilaciju ili proteolitičku degradaciju molekula, tako da kod čoveka postoji pet različitih izoformi i to: klasičan molekul od 23 kDa, glikozilovani PRL od 25 kDa, fragment PRL od 16 kDa, dimer od 50-60 kDa (tzv. veliki PRL) i agregati od 100 kDa (tzv. veliki veliki PRL; Smith i Norman, 1990; Sinha, 1995). Takođe, značajan procenat molekula prolaktina je fosforilisan na serinu i treoninu, što dodatno utiče na heterogenost ovog molekula (Walker, 1994). Smatra se da je fosforilacijom obuhvaćeno 5-30% molekula hipofiznog PRL. Međutim nije poznat njen funkcionalni značaj (Bernichtein i sar., 2001; Wu i sar., 2003).

U cirkulaciji prolaktin nije prisutan kao jedna vrsta molekula, već kao familija srodnih različito modifikovanih proteina (Smith i Norman, 1990).

1.7.1.2. Biološka funkcija prolaktina

Prolaktin ispoljava veliki broj funkcija koje mogu biti podeljene u nekoliko kategorija: a) balans vode i elektrolita, b) rast i razvoj, c) endokrina funkcija i metabolizam, d) funkcija mozga i ponašanje, e) reprodukcija, f) imunoregulacija i zaštita. Uključen je u regulaciju balansa vode i elektrolita kod skoro svih klasa kičmenjaka, što je značajno za održavanje homeostaze.

Prolaktin utiče na ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju. Stimuliše rast melanocita u koži riba i sisara, rast keratinocita kod sisara, utiče na proliferaciju hepatocita, vaskularnih glatkih mišića, β -ćelija pankreasa, astrocita i različitih ćelija imunskog sistema. Indukuje i sazrevanje pluća, diferencijaciju preadipocita, a može biti direktno ili indirektno uključen i u rast tumora (Bole-Feysot i sar., 1998).

Jedna od funkcija prolaktina je i njegov uticaj na metabolizam lipida i ugljenih hidrata. Kod sisara, stimuliše sintezu fosfolipida u plućima fetusa, aktivnost lipoprotein lipaze u jetri, a povećava i sekreciju žuči. Ispoljava i direktan efekat na funkciju pankreasa, povećavajući sekreciju insulina, smanjujući prag glukoze za sekreciju insulina i povećavajući aktivnost glikokinaze.

Pored toga, PRL povećava i sekreciju adrenalnih androgena, kortizola i aldosterona, a uključen je u roditeljsko ponašanje riba, ptica i sisara. Povećanje prolaktina u cirkulaciji odgovorno je za smanjenje libida, promene u ciklusu spavanja i budnosti, a uzrok je i lažne trudnoće žena. Ovaj hormon stimuliše i funkciju testisa. U Lejdigovim ćelijama održava ćelijsku morfologiju i povećava produkciju androgena, bitan je za pokretljivost spermatozoida i njihovo vezivanje za oocitu.

Brojne funkcije prolaktina u reprodukciji otkrivene su ispitivanjima na modelu transgenih i nokaut (knockout) miševa. PRL $-/-$ ženke miševa su potpuno sterilne i nakon nekoliko pokušaja parenja nisu dale potomstvo, što znači da je PRL značajan za reprodukciju (Horseman i sar., 1997). PRL ima i ulogu u održavanju žutog tela i produkciji progesterona kod glodara, ali ne i kod drugih sisara, dok je sinteza PRL od strane decidue

karakteristična za čoveka (Risk i Gibori, 2001). Povećan nivo PRL dovodi do inhibicije LH, FSH i nastanka kratke luteinske faze što dovodi do izostanka ovulacije i neplodnosti. Upotreba dopamina koji inhibira produkciju PRL dovodi do ponovne sekrecije LH i ovulacije za nekoliko nedelja.

PRL je značajan i za razvoj mlečnih žlezda u trudnoći (Neville i Daniel, 1987). Rast mlečnih žlezda je pod kontrolom estrogena, progesterona, insulina, glikokortikoida, GH, PL ili PRL, ali završni stadijum razvića je direktno regulisan prolaktinom. PRL je odgovoran za sintezu proteina, laktoze i lipida kao glavnih komponenti mleka.

PRL ispoljava i stimulatorni efekat na humoralni i ćelijski imunitet, povećava produkciju antitela, indukuje proliferaciju limfocita i inhibira apoptozu, aktivira makrofage i stimuliše produkciju superoksid anjona, značajnog za eliminaciju patogena.

Uloga prolaktina u patogenezi mnogih bolesti, kao što su kancer i autoimunske bolesti predmet je istraživanja mnogih grupa. Do danas je poznato da PRL povećava agresivnost kolorektalnog tumora, aktivira maligne B limfocite i ćelije limfoma, a uključen je i u patogenezu brojnih autoimunskih bolesti, kao što su: sistemski lupus eritematosus, reumatoidni artritis, bolest kalem protiv domaćina, a služi i kao marker odbacivanja u transplantaciji srca (Walker i sar., 1998). Poznata je i njegoa veza sa cističnom fibrozom, mada precizan mehanizam nije poznat (Bole-Feysot i sar., 1998).

1.7.1.3. N – terminalni 16 kDa fragment prolaktina i trudnoća

Proteolitičkom razgradnjom prolaktina enzimima katepsinom D ili matriksnim metaloproteinazama, nastaju vazoinhibini koji deluju na endotelne ćelije inhibirajući vazodilataciju i angiogenezu (Bentzien i sar., 2001; Kim i sar., 2003; Clapp i sar., 2006). Kako endotelne ćelije produkuju PRL, različite izoforme PRL i 16 kDa fragment bi mogli funkcionisati kao autokrini regulatori angiogeneze. Proteoliza molekula PRL jedan je od glavnih posttranslacionih događaja kojim se formira veća raznovrsnost u delovanju PRL, jer nastali N-terminalni fragmenti ispoljavaju drugačije efekte u odnosu na zreo molekul.

Oni inhibiraju angiogenezu *in vivo* i *in vitro* tako što stimulišu apoptozu endotelnih ćelija aktivacijom kaspazne kaskade i inhibicijom anti-apoptotičnih molekula Bcl-2 familije. N-terminalni fragmenti PRL nađeni su u cirkulaciji samo kod trudnih žena, a povećano se ekspimiraju kako se bliži porođaj i kod žena sa preeklampsijom (Sinha i sar., 1985). Efekat ovog fragmenta pokazan je i na ćelijama tumora, gde on inhibira vaskularizaciju tumora i njegov rast (Struman i sar., 1999; Martini i sar., 2000; Bentzien i sar., 2001).

Proteolitički enzimi mogu da obrazuju i druge prolaktinske fragmente sa istom molekulskom masom. Trombin razgrađuje molekul prolaktina i formira se C-terminalni fragment od 16 kDa čije se dejstvo razlikuje od N-terminalnog fragmenta, obzirom da ne ispoljava anti-angiogeno delovanje (Khurana i sar., 1999). Nije poznato da li ovaj fragment ima neku posebnu biološku ulogu ili se cepanjem molekula ograničava biološka aktivnost hormona.

Smatra se da hormoni i proteaze odgovorne za formiranje proteinskih fragmenata treba da budu ispoljene na istom mestu i da njihovi nivoi ekspresije treba da budu povezani sa njihovom angiogenom aktivnošću. Zanimljivo je napomenuti da su katepsin D, koji cepa PRL, i trombin, koji cepa PRL i PGH, prisutni na mestu kontakta decidue i placente (Soares i sar., 1991; Walker i sar., 1991; Ben-Jonathan i sar., 1996; Bentzien i sar., 1997). Struman i sar. (1999) su postavili hipotezu da regulacija produkcije i proteolitičkog cepanja članova PRL/GH familije predstavlja mehanizam za modulisanje vaskularizacije placente.

1.7.1.4. Uloga prolaktina u trudnoći

Iako postoje mnoga saznanja o ulozi PRL, do danas nije jasno određena specifična funkcija decidualnog PRL u trudnoći kod čoveka, mada je poznato da je PRL uključen u implantaciju blastociste kod pacova (Ben-Jonathan i sar., 1996). Istraživanja kod čoveka i marmota su pokazala da je ekspresija PRL minimalna za vreme proliferativne i rane sekretorne faze menstrualnog ciklusa i da se postepeno povećava tokom sekretorne faze ciklusa. Ekspresija PRL je ograničena na stromalni odeljak endometrijuma, dok je ekspresija PRLR koji prati ekspresiju PRL lokalizovana pretežno u žlezdanim epitelnim

ćelijama. Koordinisani vremenski obrazac ekspresije PRL i PRLR u endometrijumu sugerirše da PRL može imati značajnu ulogu u procesu implantacije i održavanju trudnoće. Uloga endometrijalnog PRL pokazana je kod miševa kojima su "nokautirani" geni za PRL i PRLR. Tretman ovih miševa progesteronom nije bio dovoljan da se spreči smrt fetusa i prevremeni prekid trudnoće (Bao i sar., 2003). Pokazano je povećanje ekspresije IL-6, hidroksisteroid dehidrogenaze (20α -HSD) i aktivina A, koji deluju nepovoljno na normalnu decidualizaciju i preživljavanje, a utišani su kod normalnih miševa. Bao i sar., (2003) su pokazali da tretman prolaktinom omogućava uspostavljanje normalne funkcije decidue i plodnost kod PRL null miševa.

Sa druge strane, postoji mišljenje da je potencijalna uloga PRL u procesu implantacije modifikovanje imunskog statusa endometrijuma ili regulacija ekspresije faktora unutar žlezdanog odeljka koji kontrolišu trofoblastnu proliferaciju i invaziju endometrijuma (Jabbour i sar., 1998; Jones i sar., 1998). Prisustvo prolaktinskog receptora otkriveno je na velikim granularnim limfocitima (CD56+ NK ćelije) prisutnim u decidui (King i sar., 1989). Smatra se da interakcija ovih limfocita sa invazivnim trofoblastnim ćelijama ograničava invaziju endometrijuma, što je potrebno za uspešnu implantaciju (Klentzeris i sar., 1994). S druge strane, opisan je efekat citokina koje luče decidualni makrofagi na oslobađanje PRL iz endometrijuma. Pokazano je da u primarnoj kulturi stromalnih decidualnih ćelija koje su izložene TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , TGF- β i IL-8 postoji dozno-zavisna inhibicija sinteze i oslobađanja PRL (Jikihara i Handwerger, 1994; Vićovac i sar., 1994). Smatra se da bi citokinima inhibirano dejstvo endometrijalnog PRL moglo izazvati smanjeno regrutovanje endometrijalnih CD56+ NK ćelija, i posledično kompromitovati implantaciju embriona i placentaciju. Vićovac i sar. (1994) su pokazali da TNF- α , IL-1, PDGF (faktor rasta trombocitnog porekla) i TGF- β koji produkuju aktivirani makrofagi ili druge ćelije imunskog sistema, a koje su prisutne u decidui, inhibiraju produkciju PRL od strane decidualnih ćelija. Smatra se da interakcija makrofaga i decidualnih ćelija u placentnom ležištu može biti značajna u regulaciji decidualne sekretorne aktivnosti.

Lokalno produkovan PRL može uticati na diferencijaciju decidualnih ćelija i pripremanje uterusa za implantaciju embriona. Eyal i sar. (2007) smatraju da lokalno izlučen PRL ispoljava autokrino delovanje tako što ograničava decidualizaciju, za sada nepoznatim mehanizmom.

U ranom stadijumu razvića embriona koji se odvija u hipoksičnim uslovima i obuhvata period od 5. do 8. nedelje gestacije, embrion je okružen proliferativnim, neinvazivnim EVT ćelijama. Parra i sar. (2002) sugerišu da je za vreme ovog stadijuma razvića glavna forma PRL od 16 kDa, dok je forma od 23 kDa inhibirana pomoću IL-2 i niskog parcijalnog pritiska kiseonika. U sledećem stadijumu razvića od 8. do 10. nedelje gestacije, dolazi do smanjenja produkcije IL-2, što predstavlja normalni imunski odgovor u trudnoći i u smislu promene sekrecije citokina od Th1 ka Th2 tipu. Time prestaje inhibicija produkcije forme od 23 kDa, koja sada postaje dominantna i favorizuje angiogenezu. U sledećem stadijumu gestacije, od 10. do 12. nedelje, prisustvo forme od 23 kDa i povećanje parcijalnog pritiska kiseonika utiču na trofoblastne ćelije koje postaju invazivne i koje vrše invaziju spiralnih arterija miometrijuma.

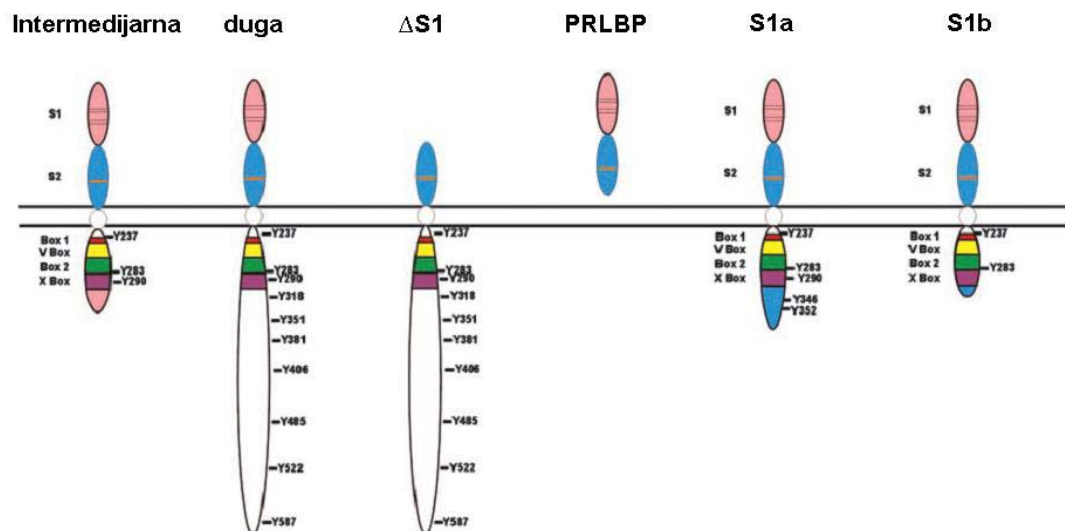
Prolaktin kojeg izlučuje humani endometrijum vezuje se za heparin, što nije primećeno kod drugih vrsta sisara, niti kod drugih članova PRL/GH familije i akumulira se u vanćelijskom matriksu decidue. Na taj način moduliše razvoj uterušnih žlezda i njihovu funkciju, angiogenezu, diferencijaciju i funkciju trofoblastnih ćelija i imunoregulaciju, a ima uticaj i na amnion i fetalna tkiva (Khurana i sar., 1999; Wang i sar., 2000). Ne vezuju sve forme PRL heparin. Postoje dve heparin vezujuće sekvence, jedna između 41-47 i druga između 175-181, a koje mogu postati nedostupne savijanjem proteina. Ove sekvence nisu prisutne u primarnoj strukturi humanog GH i PL, tako da ovi proteini ne mogu da vezuju heparin. Smatra se da vezivanje proteina za proteoglikane ECM može da ih zaštiti od inaktivacije, kao i da poveća vezivanje za membranske receptore ili olakša razgradnju proteolitičkim enzimima (Bikfalvi i sar., 1997). Šta je od iznetog značajno za biološku aktivnost PRL danas je nepoznato.

1.7.1.5. Prolaktinski receptor (PRLR)

Receptor za PRL pripada klasi I citokinskih receptora u koju spadaju i receptori za nekoliko interleukina, granulocitni faktor stimulacije kolonija (G-CSF), granulocitno-makrofagni faktor stimulacije kolonija (GM-CSF), leukemija inhibitorni faktor (LIF), onkostatin M (OM), eritropoetin (EPO), trombopoetin (TPO), gp 130 i leptin (Bole-Feysot i sar., 1998). Gen koji kodira PRLR nalazi se na hromozomu 5 blizu gena za receptor hormona rasta i sastoji se od najmanje 10 egzona ukupne dužine od 100 kb (Arden i sar., 1990). Ispitivanja na pacovima pokazala su prisustvo tri različita promotora za PRLR gen, koji mogu biti odgovorni za različitu tkivno-specifičnu ekspresiju i prenos signala preko različitih signalnih puteva, ali to nije pokazano i kod čoveka (Hu i sar., 1997). Prisustvo više različitih izoformi, kao što su duga, intermedijarna, $\Delta S1$, kratke forme (S1a i S1b) i PRL-vezujući protein rezultat je alternativne obrade primarnog RNK transkripta (**Slika 11**). Ove izoforme razlikuju se po dužini i sastavu citoplazmatskih repova, signalnim svojstvima i biološkim efektima.

Duga forma je osnovna izoforma prolaktinskog receptora i sastoji se od vanćelijskog, transmembranskog i citoplazmatskog domena. Intermedijarna forma receptora nastaje alternativnom obradom primarnog transkripta pri čemu dolazi do uklanjanja svih kodirajućih sekvenci C-terminalnog dela do Box elemenata i dodavanja 13 novih aminokiselina, tako da ova forma receptora može aktivirati druge signalne puteve u odnosu na dugu formu (Kline i sar., 1999). $\Delta S1$ izoforma takođe nastaje alternativnom obradom primarnog transkripta. Ona ne sadrži prvi S1 domen vanćelijskog domena, tako da je afinitet ove forme za PRL sedam puta manji od afiniteta duge i intermedijarne forme (Klinet i sar., 1999; Kline i sar., 2002). S1a kratka forma receptora sadrži Box 1 i Box 2 elemente i dodatnih 39 aminokiselina na C-terminalnom kraju, dok S1b forma sadrži samo Box 1 element, a nema Box 2 (Hu i sar., 2001). PRL-vezujući protein (PRLBP) predstavlja slobodno cirkulišući vanćelijski domen prolaktinskog receptora. Do danas nije poznato da li je PRL-vezujući protein kao solubilna forma receptora nastao alternativnom obradom

primarnog transkripta ili proteolitičkom razgradnjom PRLR vezanog za membranu (Amit i sar., 1997).



Slika 11. Izoforme prolaktinskog receptora (Clevenger i sar., 2003).

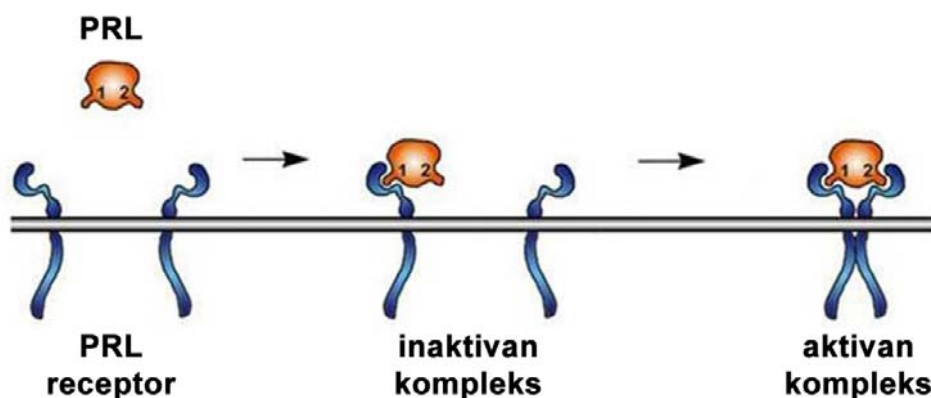
Vančelijski domen (engl. extracellular domain - ECD) je identičan kod različitih izoformi i sastoji se od ~ 200 aminokiselina, koje čine region homolog citokinskim receptorima (engl. cytokine receptor homology region - CRH; Wells i De Vos, 1996). Ovaj region može biti podjeljen na dva subdomena od oko 100 aminokiselina (označeni kao S1 i S2 ili D1 i D2 subdomeni), koji nalikuju domenu fibronektin tipa III. Svaki subdomen sadrži sedam β -ploča spakovanih u sendvič, koji formiraju dve antiparalelne β -ploče. Jedna β -ploča je sastavljena od tri lanca označena kao lanac A, B i E, a druga je sastavljena od četiri preostala lanca, C, C', F i G (Kossiakoff i sar., 1994; Goffin i sar., 1998). Subdomeni su povezani pomoću malog polipeptida sastavljenog od četiri aminokiselinska ostatka (Somers i sar., 1994). Ovakav ECD postoji i kod GHR, EPO receptora, kao i mnogih drugih receptora za citokine (Caravella i sar., 1996). Vančelijski domen sadrži i dva visoko konzervirana mesta, to su dva para disulfidno vezanih cisteina u N-terminalnom subdomenu S1 (Cys12-Cys22 i Cys51-Cys62) i pentapeptid označen kao "WS motiv" (Trp-

Ser-X-Trp-Ser) koji se nalazi u C-terminalnom subdomenu S2 u regionu koji je bliži membrani.

Receptor za prolaktin, kao i drugi citokinski receptori, pored ECD ima i jedan transmembranski domen. Učešće ovog regiona u funkcionalnoj aktivnosti receptora je nedovoljno poznato. Na ovaj domen nadovezuje se citoplazmatski domen, koji sadrži dva relativno konzervirana regiona označena kao Box 1 i Box 2. Box 1 je region bliži membrani i sastoji se od osam aminokiselina, od kojih preovlađuje prolin. Motivi obogaćeni prolinom su specifična mesta prepoznavanja molekula uključenih u prenos signala. Box 2 je manje konzerviran od Box 1 i sastoji se od hidrofobnih negativno naelektrisanih, pa pozitivno naelektrisanih aminokiselinskih ostataka. Box 1 postoji kod svih izoformi receptora, a Box 2 nije nađen u S1b kratkoj formi receptora (Kelly i sar., 1991; Goffin i sar., 1998). Vincent i sar. (1997) su detektovali unutar citoplazmatskog domena kratkih formi receptora dva motiva potrebna za internalizaciju receptora. Prvi uključuje dileucin motiv (aminokiseline 259-260), a drugi sadrži tetrapeptid koji omogućava savijanje u β -navoj. Duga izoforma receptora manje internalizuje od kratke forme zbog nedostatka motiva sa β -navojem (Vincent i sar., 1997). "WS motiv" u vanćelijskom domenu je bitan za afinitet vezivanja liganda, iako je udaljen od ligand-vezujuće površine. Mutacija u ovom delu nepovoljno utiče na afinitet vezivanja (Baumgartner i sar., 1994). Na osnovu funkcionalnih ispitivanja drugih citokinskih receptora, smatra se da je uloga "WS motiva" u pravilnom pakovanju i prenosu signala, a ne vezivanju liganda, mada su dva triptofana (Trp72 i Trp139) u prolaktinskom receptoru uključena u vezivanje prolaktina (Quelle i sar., 1992). Takođe se smatra da je "WS motiv" potreban za održavanje strukture S2 subdomena blizu plazma membrane (Somers i sar., 1994).

Najmanje dva regiona PRL su odgovorna za vezivanje receptora. Vezujuće mesto 1 obuhvata nekoliko aminokiselinskih ostataka koji pripadaju heliksu 1 i 4, dok vezujuće mesto 2 uključuje heliks 1 i 3 (Goffin i sar., 1994; Kinet i sar., 1996). Vezivanje hormona za receptor odvija se u dve faze: prvo se PRL preko vezujućeg mesta 1 vezuje za jedan PRLR i formira se inaktivni kompleks (jedan hormon, jedan receptor). Formiranje ovog kompleksa je preduslov za interakciju između vezujućeg mesta 2 prolaktina i drugog

PRLR, tako da se formira aktivan trimeričan kompleks sastavljen od jednog hormona i jednog homodimera receptora (**Slika 12**). Pokazano je da su prolaktinski analozi, koji imaju mutaciju u vezujućem mestu 2, inaktivni jer ne mogu da indukuju dimerizaciju receptora. Oni deluju kao antagonisti, i blokiraju receptor u inaktivnom kompleksu (Goffin i Kelly, 1996; Goffin i sar., 1996).



Slika 12. Vezivanje prolaktina za homodimer receptora (Bole-Feysot i sar., 1998).

Ispitivanja receptora za hormon rasta su pokazala njegovu predimerizaciju *in vivo* u odsustvu liganda (Brown i sar., 2005). Gadd i Clevenger (2006) su pokazali da duga i intermedijerna forma receptora mogu da dimerizuju nezavisno od vezivanja liganda. Takođe, pokazano je i da se ligand-nezavisna dimerizacija odvija preko transmembranskog domena, što međutim nije dovoljno za aktivaciju receptora (Gadd i Clevenger, 2006). Ligand aktivira preformirane dimere, a aktivacioni mehanizam uključuje rotaciju subjedinica unutar dimeričnog receptora kao rezultat asimetričnog postavljanja receptor-vezujućih mesta na ligandu (Brown i sar., 2005).

Prolaktinski receptor spada u grupu receptora koji interaguju sa tirozin kinazama citosola. Sam po sebi nema tirozin kinaznu aktivnost, ali njegova dimerizacija vodi do brze fosforilacije tirozinskih ostataka Janus kinaze 2 (JAK2) vezane za receptor, i njene aktivacije. Ona fosforiliše receptor na specifičnim tirozinskim ostacima u njihovom C-

terminalnom regionu (Tyr 580 u dugoj formi), a zatim dolazi do fosforilacije, dimerizacije i transporta STAT 5 (engl. Signal Transducers and Activators of Transcription) u jedro (Wakao i sar., 1994; Leburn i sar., 1995). U prenos signala nakon angažovanja PRLR uključena su tri STAT molekula, STAT 1, STAT 3 i glavni STAT 5. STAT 5 postoji u vidu dve izoforme (5a i 5b) sa ~ 96% sličnih aminokiselina koje formiraju heterodimere koji se vezuju za DNK elemente i indukuju transkripciju ciljnih gena (Hennighausen i sar., 1997). Box 1 region je potreban za vezivanje i aktivaciju JAK2 kinaze (Leburn i sar., 1995). Inhibitori JAK-STAT puta su SOCS (supresori prenosa signala preko citokina), koji stupaju u interakcije sa JAK molekulima ili SSI (STAT-indukovani STAT inhibitori), koji su u konkurenciji sa STAT molekulima za vezivanje za receptor. Smatra se da je neki od ovih negativnih regulatora uključen u inhibiciju prenosa signala preko PRLR, mada za to još uvek ne postoje podaci.

JAK2-STAT kaskada je glavni signalni put koji se aktivira vezivanjem liganda za PRLR. Međutim, pored njega i drugi signalni putevi mogu biti uključeni u prenos signala nakon aktivacije receptora. Duga forma receptora podleže fosforilaciji tirozina i na drugim mestima, što bi moglo da znači da su druga mesta uključena u alternativne signalne puteve, koji vode do aktivacije drugih gena. Das i Vonderhaar (1995) su pokazali da duga i kratka forma receptora stimulišu proliferaciju preko MAP kinaznog puta (engl. Mitogen Activated Protein Kinase - MAPK). Pored MAPK signalnog puta, postoje i drugi signalni putevi, kao što su put koji uključuje aktivaciju proteina Vav, fosforilaciju tirozinskih ostataka supstrata insulinskog receptora 1 (IRS-1) i 85 kDa subjediniice fosfatidilinozitol (PI)-3' kinaze. Takođe dolazi, do c-Src-kinazom posredovane aktivacije Fak/Erk1/2 signalnih puteva koji kontrolišu ekspresiju c-Myc i ciklin D i proliferaciju (Clevenger i sar., 1995; Berlanga i sar., 1997; Bole-Feysot i sar., 1998).

Receptori za PRL prisutni su u brojnim tkivima sa različitim udelom duge i kratkih formi receptora (Nagano i Kelly, 1994). Različite izoforme imaju različita signalna svojstva. Nivo ekspresije pojedinih izoformi u različitim tkivima mogao bi da bude ključan faktor u odgovoru ćelije na različita fiziološka i patološka stanja. Obzirom da ćelije ispoljavaju više različitih izoformi, heterodimerizacija različitih formi receptora može

modulisati funkciju prolaktina kroz formiranje inaktivnih receptorskih kompleksa, a što može biti fiziološki značajno. Pored toga, različite izoforme receptora ostvaruju različito dejstvo preko receptor-specifične signalne kaskade.

CILJ ISTRAŽIVANJA

Moguća fiziološka uloga prolaktina u uspostavljanju i održavanju rane trudnoće je nedovoljno ispitana. Dosadašnja istraživanja ukazuju na prolaktin kao jedan od markera decidualizacije, kao i ekspresiju prolaktinskog receptora u trofoblastu i različitim odeljcima endometrijuma, što bi moglo da ukaže na ulogu prolaktina u ranoj trudnoći. U raspoloživoj literaturi pored podataka o ekspresiji prolaktinskog receptora u epitelnim i stromalnim ćelijama endometrijuma, postoje i podaci o ekspresiji prolaktinskog receptora u decidui, trofoblastu horiona, amnionskom epitelu, ali nema pouzdanih podataka o ekspresiji prolaktinskog receptora na ekstravilusnim citotrofoblastnim ćelijama placente prvog trimestra.

Što se tiče funkcionalnih svojstava prolaktina, u literaturi postoje podaci koji se odnose na uticaj prolaktina na različite ćelije i ekspresiju adhezionih molekula i proteolitičkih enzima, značajnih za ćelijsku migraciju. U skladu sa navedenim osnovni cilj istraživanja obuhvaćen ovim radom bio je ispitivanje potencijalnog biološkog značaja prolaktina za proces implantacije i placentacije, korišćenjem *in vitro* modela ćelijske adhezije, migracije, invazije, proliferacije i apoptoze. Iz ovoga su proizašli sledeći ciljevi istraživanja:

- Ispitivanje ekspresije prolaktinskog receptora u trofoblastnim ćelijama placente prvog trimestra i HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji, kao i identifikacija eksprimiranih formi receptora kod oba tipa ćelija.
- Ispitivanje uticaja prolaktina na funkciju trofoblasta, i to adheziju, migraciju, invaziju, proliferaciju i apoptozu ćelija trofoblasta *in vitro*.
- Ispitivanje uticaja prolaktina na markere invazivnog fenotipa trofoblasta, kao što su integrini α_1 , α_5 , kao i gal-1 i matriksne metaloproteinaze MMP-2 i MMP-9.

MATERIJAL I METODE

3.1. Antitela

Kao primarna antitela u ovom radu korišćena su različita monoklonska i poliklonska antitela, prikazana u **Tabeli I** sa tehnikama i upotrebljenim razblaženjima. Kao sekundarna antitela korišćena su:

- anti-koza IgG kunića (imunohistohemija, imunocitohemija 1/200 i imunoblot 1/5000), anti-miš IgG konja (imunocitohemija 1/200 i imunoblot 1/2000) i anti-kunić IgG koze (imunocitohemija 1/200 i imunoblot 1/750), obeležena biotinom (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).
- Anti-koza IgG kunića obeležena FITC (1/500 – FACS, Sigma, USA), anti-koza IgG kunića obeležena Texas Red (1/300 – imunocitohemija, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) i anti-miš IgG koze obeležena AlexaFluor® 488 (1/1000 – FACS, Molecular Probes, Inc., Invitrogen, Eugen, OR, USA) antitela.

Tabela I. Pregled primarnih monoklonskih i poliklonskih antitela

Primarno antitelo	Monoklonsko (m) poliklonsko (p)	Tehnike/razblaženje	Referenca/ proizvođač
Anti-citokeratin-7 (CK-7)	m	Imunocitohemija 1/150; imunohistohemija 1/75	Dako, Glostrup, Denmark
Anti-CD45	m	Imunocitohemija 1/100	AbD Serotec, Raleigh, NC, USA
Anti-PRLR	p	Imunohistohemija 1/20; imunocitohemija i FACS 1/8; imunoblot 1/100	R&D Systems, Oxford, UK
Anti-integrin α_1	m	imunoblot 1/3000	R&D Systems, UK
Anti-integrin α_5	p	imunoblot 1/750	Santa Cruz, CA, USA
Anti-gal-1	p	imunoblot 1/1000	R&D Systems, UK
Anti- β -aktin	p	Imunoblot 1/400 i 1/3000	Sigma, USA
Anti-Ki67	p m	Imunocitohemija 1/250 i FACS 1/50	Santa Cruz, CA, USA Dako, Glostrup, Denmark
Anti-M30	m	Imunocitohemija 1/75	Roche, Germany

3.2. Tkivni uzorci

U ovom radu korišćeno je tkivo normalne placente prvog trimestra trudnoće gestacijske starosti od 6. do 12. nedelje, dobijeno nakon legalnih prekida trudnoće u Ginekološko-akušerskoj klinici Kliničkog centra Srbije i VMA u Beogradu. Tkivo je korišćeno za izolovanje citotrofoblastnih ćelija i imunohistohemijsku analizu.

Dobijeno tkivo placente je ispirano u PBS, fiksirano u 10% formalinu i kalupljeno u parafinske blokove. Rezovi tkiva debljine 5 μm sečeni su na mikrotomu i fiksirani na mikroskopske pločice prethodno prevučene rastvorom poly-L-lysine-a (Sigma, St. Louis, MO, USA). Na rezovima je analizirana ekspresija specifičnih proteina.

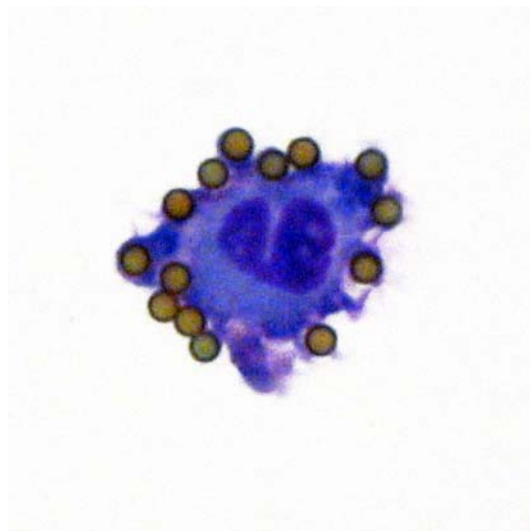
3.3. Kultura ćelija

3.3.1. Izolovanje i kultura citotrofoblastnih ćelija prvog trimestra

Citotrofoblastne ćelije su izolovane prema proceduri koju su opisali Vićovac i saradnici (Vićovac i sar., 2007), sa manjim modifikacijama. Placenta je ispirana u sterilnom 0,05 M fosfatnom puferu pH 7,2 (PBS) koji sadrži gentamicin. Tkivo placente je podvrgavano enzimskoj digestiji u 0,25% tripsinu (Torlak, Beograd, Srbija) sa 0,2 mg/ml DNaze I (Applichem GmbH, Darmstadt, Germany) i 5 mM MgCl_2 na 37 °C (2 ciklusa po 25 min.). Nakon svakog ciklusa, ćelije su filtrirane kroz najlonsko sito (40 μm , Nylon Bolting Cloth, Lochdew, Warrington, UK), sakupljane i prane hladnim PBS/0,1% BSA. Dejstvo tripsina je blokirano FCS (engl. fetal calf serum - FCS). Ćelije su zatim resuspendovane u 20% Percoll i razdvajane centrifugiranjem u diskontinualnom gradijentu Percoll-a (5 ml 20%, 5 ml 35% i 2,5 ml 50%, Pharmacia, Biotech AB, Stockholm, Sweden) 30 min na 2800 rpm, 10 °C. Citotrofoblastne ćelije formiranog prstena ispirane su u PBS/0,1% BSA, a zatim je određivan njihov broj, vijabilnost i čistoća.

Za detekciju izoformi PRL receptora u citotrofoblastnim ćelijama imunoblotom, kao i protočnom citofluorimetrijom, bilo je potrebno prečistiti ćelijsku suspenziju, tj. odstraniti ćelije poreklom iz kostne srži koje ispoljavaju ovaj receptor.

Korišćene su magnetne kuglice Dynabeads – M280 obložene anti-mišijim IgG ovce (Molecular Probes, Inc., Invitrogen, Eugen, OR, USA), na kojima su imobilisana anti-CD45 antitela. Ćelije su inkubirane sa ovim antitelima jedan sat na rotacionoj platformi na 4 °C. Kuglice sa vezanim CD45-pozitivnim ćelijama odstranjivane su korišćenjem magneta (**Slika 13**). Čistoća je procenjivana na citospinovima prečišćenih ćelija, bojenjem na markere CK-7 i CD45. Procenat citotrofoblastnih ćelija bio je $\geq 98\%$.



Slika 13. CD45-pozitivna ćelija sa vezanim magnetnim kuglicama.

Za imunocitohemijska ispitivanja ćelije su gajene na pokrovnim stakalcima preko noći u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂, na 37 °C u medijumu DMEM/F12 sa 10% FCS (PAA Laboratories, Linz, Austria), fiksirane ledenim acetom-metanolom (1:1) i čuvane na -20 °C do bojenja.

Izolovane citotrofoblastne ćelije su korišćene i u funkcionalnom testu ćelijske invazije *in vitro*.

3.3.2. Ekstravilusna trofoblastna ćelijska linija HTR-8/SVneo

Ćelijska linija HTR-8/SVneo dobijena je ljubaznošću dr Charles H. Graham-a (Queen's University, Kingston, ON, Canada). Ova ćelijska linija nastala je transfekcijom ekstravilusnih ćelija humane placentе prvog trimestra trudnoće SV40 T antigenom (Graham i sar., 1993; Irving i sar., 1995). HTR-8/SVneo ćelijska linija je hiperproliferativna i hiperinvazivna linija koja eksprimira markere normalnih invazivnih ekstravilusnih ćelija (King i sar., 2000). Ove ćelije su gajene u RPMI 1640 medijumu sa 5% FCS (PAA Laboratories, Linz, Austria) i rastvorom antibiotika i antimikotika (PAA Laboratories, Linz, Austria), što predstavlja kompletan medijum. Ćelije su gajene u plastičnim flaskovima na 37 °C, 5% CO₂. HTR-8/SVneo ćelije su korišćene u imunocitohemijskom i citofluorimetrijskom ispitivanju, MTT testu i testu za ispitivanje broja adherentnih ćelija, kao i u funkcionalnim testovima adhezije, migracije i invazije *in vitro* i Western blot analizi proteina.

Za imunocitohemijsko ispitivanje ćelije su gajene na pokrovnim stakalcima, sa ili bez tretmana, do približno 80% konfluentnosti. Isprane ćelije su fiksirane ledenim aceton-metanolom i čuvane na -20 °C do bojenja.

Za potrebe MTT testa i testa određivanja broja adherentnih ćelija, HTR-8/SVneo ćelije su gajene u pločama sa 96 mesta, u koncentraciji 2×10^4 ćelija/bazenu u 100 µl kompletnog medijuma. Nakon 24 sata, ćelije su ispirane toplim PBS i gajene 24 časa bez (kontrola) ili sa PRL (100 ng/ml i 1000 ng/ml) u 200 µl kompletnog medijuma. Za potrebe određivanja broja adherentnih ćelija, ćelije su dobro sušene i fiksirane hladnim rastvorom aceton-metanola.

Za pripremu ćelijskih lizata HTR-8/SVneo ćelije su gajene u plastičnim flaskovima 24 sata u kompletnom medijumu bez (kontrola) ili sa PRL (100 ng/ml i 1000 ng/ml). Nakon inkubacije, ćelije su tretirane hladnim 5 mM EDTA/PBS i brojane. Za potrebe Western blot analize ćelije su lizirane u puferu za uzorke koji je sadržao inhibitor proteaza (Sigma, St Louis, MO, USA).

3.4. Imunohistohemija

Imunohistohemijska ispitivanja vršena su na parafinskim presecima tkiva placente prvog trimestra. Tkivni uzorci su deparafinisani u ksilolu (10 min), a zatim rehidratirani u etanolu (10 min). Aktivnost endogenih peroksidaza je blokirana inkubacijom u 0,3 % rastvoru H₂O₂ u 70% etanolu tokom 30 min. Uzorci su ispirani u destilovanoj vodi i PBS i nespecifično vezivanje blokirano je normalnim serumom kunića (NKS) ili normalnim konjskim serumom (NHS). Tkivni isečci su inkubirani preko noći na 4 °C primarnim antitelima prema PRLR i CK-7 (**Tabela I**) i ispirani PBS. Kao sekundarna antitela korišćena su odgovarajuća biotinizirana anti-koza IgG kunića (za PRLR) i anti-miš IgG konja (za CK-7) antitela, sa kojima su rezovi inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi. Tkivni isečci su zatim ispirani i inkubirani sa Vectastain Elite ABC reagensom 30 min (A-avidin, B-biotinizirana peroksidaza iz rena, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Rezovi su bojeni DAB (3, 3' diaminobenzidin, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), a ćelijska jedra hematoksilinom. Dehidratirani preparati su montirani u VectaMount Permanent Mounting smoli (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) i analizirani na Carl Zeiss Axio Imager 1.0 mikroskopu (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

3.5. Imunocitohemija

Izolovane citotrofoblastne i HTR-8/SVneo ćelije gajene su na pokrovnim stakalcima, fiksirane i pripremljene za dalje bojenje. Ćelije su zatim rehidratirane u PBS, a aktivnost endogenih peroksidaza blokirana je 0,3% rastvorom H₂O₂ u PBS 30 min na sobnoj temperaturi. Nespecifično vezivanje je blokirano konjskim, kozijim ili serumom kunića, u zavisnosti od upotrebljenog sekundarnog antitela. Protokol inkubacije sa primarnim antitelima je bio sledeći:

- izolovane citotrofoblastne ćelije su inkubirane sa antitelima prema CK-7 (1 sat na sobnoj temperaturi), a zatim prema PRLR (preko noći na 4 °C)

- HTR-8/SVneo ćelije su inkubirane sa antitelima prema PRLR (preko noći na 4 °C), Ki67, M30 (1 sat na sobnoj temperaturi).

Nakon ispiranja nevezanih antitela, ćelije su inkubirane 30 min sa sekundarnim anti-miš IgG konja ili anti-kunić IgG koze obeleženih biotinom, ili anti-koza IgG kunića obeleženih Texas Red antitelima u slučaju fluorescentnog bojenja HTR-8/SVneo ćelija. U sledećem koraku ćelije su inkubirane sa ABC reagensom 30 min, a reakcija je vizuelizovana inkubacijom sa rastvorom DAB. Za potrebe dvostrukog bojenja, izolovane trofoblastne ćelije su prvo identifikovane bojenjem antitelom na CK-7, a zatim inkubirane sa antitelom na PRLR. Reakcija je vizualizovana sekundarnim anti-miš IgG koze obeleženim Alexa 488 ili anti-koza IgG kunića obeleženim Texas Red antitelima. Jedra su kontrastirana hematoksilinom u slučaju vizualizacije sa DAB, odnosno 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) reagensom (ProLong[®] Gold Antifade Reagent, Molecular Probes, Inc., Invitrogen[™], Eugene, OR, USA) u slučaju fluorescentnog bojenja. Preparati su montirani i analizirani svetlosnim mikroskopom (Reichert-Jung, Vienna, Austria sa Leica Digital Camera System, Wetzlar, Germany) ili fluorescentnim mikroskopom (Carl Zeis 510 laserski mikroskop na talasnim dužinama od 595-615 nm sa AxioCam HR monohromatskom kamerom).

Kontrole su inkubirane sa odgovarajućim serumom ne-imunizovane životinje, umesto primarnog antitela, što je rezultovalo odsustvom bojene reakcije.

3.6. Izolovanje limfocita iz periferne krvi

Limfociti su izolovani iz periferne krvi zdravog davaoca. Krv je uzimana u epruvetama obloženim EDTA i razblaživana jednakom količinom 0.9% rastvora natrijum hlorida, nalivana na Lymphoprep[™] gradijent (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) i centrifugirana na 2200 rpm, 20 min na 24 °C. Nakon centrifugiranja mononuklearne ćelije, koje su formirale prsten na granici uzorak/medijum sakupljane su i ispirane PBS na 1200 rpm, 10 min, na 24 °C, dva puta. Limfociti su brojani i bojani tehnikom imunocitohemije na citospinu, kako je opisano ranije, a korišćena je i tehnika protočne citofluorimetrije.

3.7. Protočna citofluorimetrija

Protočna citofluorimetrija je korišćena za ispitivanje prisustva PRLR na izolovanim citotrofoblastnim i HTR-8/SVneo ćelijama, kao i izolovanim limfocitima. Ćelije izolovane iz placente prvog trimestra su prečišćavane korišćenjem magnetnih kuglica obloženih anti-CD45 antitelima, kao što je opisano ranije. Suspenzija citotrofoblastnih, HTR-8/SVneo ćelija i limfocita (pozitivna kontola) pravljena je u koncentraciji 5×10^5 ćelija/100 μ l PBS₂ (PBS/2%FCS/0.01% Na-azid). Ćelije su prethodno permeabilizovane u rastvoru za fiksaciju/permeabilizaciju (1:4, eBioscience, USA), preko noći na 4 °C. Ćelije su ispirane dva puta u puferu za permeabilizaciju (PB) i inkubirane sa antitelom na PRLR (**Tabela I**) 45 min na 4 °C uz povremeno mešanje na vorteksu. Nakon inkubacije, ćelije su ispirane i inkubirane sa sekundarnim antitelima (anti-koza IgG FITC u PB, **Tabela I**) 30 min na 4 °C, ispirane u hladnom PB i PBS₁ (PBS/0.01% Na-azid) i fiksirane 4% rastvorom formalina u PBS₁. Kontrolne ćelije su bile inkubirane sa ne-imunim kozjim IgG kao primarnim antitelima. Analiza fluorescentnih ćelija je vršena na protočnom citofluorimetru tipa EPICS XL-MCL (Coulter, Krefeld, Germany). Eksperimenti su ponavljani tri puta za izolovane CT i pet puta za HTR-8/SVneo ćelije.

Protočna citofluorimetrija korišćena je i za merenje apoptoze HTR-8/SVneo ćelija. Za detekciju apoptoze korišćen je postupak obeležavanja ćelija sa propidijum jodidom (PI, Sigma, St Louis, MO, USA) u hipotonom rastvoru. Apoptotične ćelije imaju smanjenu količinu DNK (usled fragmentacije DNK ćelije su hipodiploidne) i stoga je vezivanje PI, a samim tim i intenzitet fluorescence apoptotičnih ćelija smanjen (Curnow i sar., 1994).

HTR-8/SVneo ćelije (1×10^5) su sejane u ploče sa 96 mesta (Sarstedt AG. & Co., Nümbrecht, Germany). Nakon 24 sata, ćelije su ispirane toplim PBS i kultivisane narednih 24 sata sa ili bez tretmana prolaktinom od 100 ng/ml i 1000 ng/ml. Ćelije su zatim ispirane, na talog je dodavano 300 μ l hladnog hipotonog pufera (0,1% Na citrat/0.1% Triton X 100/destilovana voda) sa PI (10 μ g/ml), ostavljene preko noći u frižideru i analizirane na protočnom citofluorimetru. Ekscitujuća svetlost za uzorke obeležene propidijum jodidom je

talasne dužine 488 nm. Rezultati su predstavljeni kao numerička vrednost procenta ćelija sa hipodiploidnom količinom DNK. Eksperiment je ponavljan pet puta.

3.8. Funkcionalni testovi

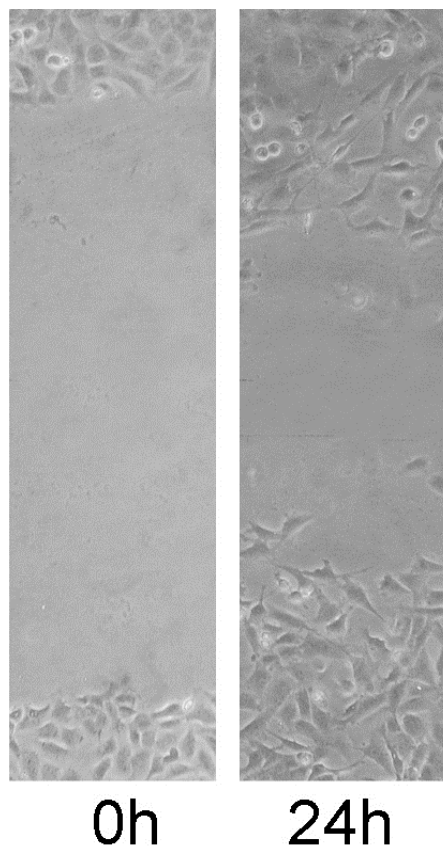
3.8.1. Test ćelijske adhezije *in vitro*

Test adhezije HTR-8/SVneo ćelija je izvođen na način opisan u literaturi (Hyytiäinen i Keski-Oja, 2003) sa malim modifikacijama. Mikrotitarske ploče su oblagane kolagenom tipa I koncentracije 250 ng/ml (100 µl/bunaru) i Matrigelom (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) koncentracije 250 ng/ml (100 µl/bunaru) u osnovnom RPMI 1640 medijumu, jedan sat na 37 °C. Nakon inkubacije bunari su ispirani PBS, a nespecifično vezivanje je blokirano sa 100 µl 3% BSA/PBS 1 sat na 37 °C. HTR-8/SVneo ćelije su preinkubirane u osnovnom RPMI 1640 medijumu bez ili sa PRL (100 ng/ml i 1000 ng/ml), tokom 2 sata 30 min na 37 °C. Po 100 µl preinkubirane ćelijske suspenzije koja je sadržala 2.5×10^4 ćelija dodavano je u svaki bunar ploče sa 96 mesta. Nakon 2 sata inkubacije na 37 °C, bunari su pažljivo ispirani PBS, a ćelije fiksirane sa 50 µl ledeno hladnog aceton-metanola, 10 min. Ćelije su zatim bojene sa 50 µl 0,05% rastvora boje Crystal violet u 25% metanolu, 5 min, a boja je rastvarana 0,1M Na-citratom u 50% etanolu. Optička gustina je merena na 540 nm, a intenzitet boje je odgovarao broju adherentnih ćelija. Eksperiment je ponavljan pet puta, sa n=6 po tretmanu u svakom ogledu.

3.8.2. Test ćelijske migracije *in vitro* metodom “Wound healing”

HTR-8/SVneo ćelije ($1.5 \times 10^5/300\mu\text{l}$) su gajene u pločama od 24 mesta (Sarstedt AG. & Co., Nümbrecht, Germany) u kompletnom medijumu do konfluentnosti. Sterilnim nastavkom pipete je povučena linija na sredini bazena i ćelijski sloj je uklonjen (**Slika 14**). Bazeni su zatim ispirani PBS i inkubirani 24 sata u 1% FCS medijumu bez (kontrola) ili sa PRL (100ng/ml i 1000ng/ml), na 37 °C. Ćelije su fotografisane po ozleđivanju i posle

tretmana od 24 sata, a pređeni put je meren pomoću elektronske mreže. Eksperimenti su urađeni osam puta u duplikatu.



Slika 14. Test ćelijske migracije *in vitro* metodom “Wound healing”

3.8.3. Test ćelijske invazije *in vitro*

Mogući efekat prolaktina na invaziju izolovanih citotrofoblastnih i HTR-8/SVneo ćelija je ispitivan po metodi koju su opisali Librach i saradnici (1991). Umetci za ćelijsku kulturu veličine pora 8 μm (Millipore, MA, USA, **Slika 15**), oblagani su sa 10 μL Matrigela (2,5 mg/ml) u osnovnom DMEM/F12 za izolovani citotrofoblast i osnovnom RPMI 1640 za HTR-8/SVneo ćelije. Matrigel je ostavljan da gelira 30 min na 37 °C. U gornju komoru umetka nanošeno je 200 μl ćelijske suspenzije u kojoj se nalazilo 2×10^5 citotrofoblastnih ćelija (10% FCS/DMEM/F12) ili 1×10^5 HTR-8/SVneo ćelija u 1%

FCS/RPMI 1640 medijumu bez (kontrola) ili sa PRL (100ng/ml i 1000ng/ml). Po 500 μ l odgovarajućeg kompletnog medijuma je dodavano i u donju komoru.



Slika 15. Umeci za test ćelijske invazije

Nakon inkubacije od 20 sati za izolovani citotrofoblast i 24 sata za HTR-8/SVneo ćelije, medijum je uklanjan, a ćelije ispirane PBS. Gornja površina membrane je nežno brisana pamučnim tupferom, a ćelije na donjoj površini su fiksirane ledeno hladnim acetonmetanolom, 10 min na sobnoj temperaturi. Membrane su skidane skalpelom, a ćelije na njima bojene imunocitohemijski monoklonskim antitelom prema CK-7 u slučaju izolovanog trofoblasta i Gimzom u slučaju HTR-8/SVneo ćelija. Ćelije u porama ili na donjoj strani membrane su brojane pod svetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss Axio Imager 1.0 mikroskop) na celoj površini membrane. Eksperimenti su ponavljani 4 puta u duplikatu za citotrofoblast i 5 puta u duplikatu za HTR-8/SVneo ćelije.

3.9. Odredjivanje vijabilnosti ćelija (MTT test)

Vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija je ispitivana MTT testom (MTT- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide; Tiazolil plavo, Sigma, St Louis, MO, USA; Hanisch i sar., 1993). Ćelije su sejane u ploču od 96 mesta ($2 \times 10^4/100\mu$ l

medijuma) i inkubirane preko noći na 37 °C, a potom prane dva puta PBS i inkubirane 24 sata sa i bez tretmana. Čelije su zatim ispirane PBS i inkubirane dva sata na 37 °C u 100 µl rastvora MTT (1 mg/ml) u PBS sa 10% FCS. Rastvor MTT je uklanjan, 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. Eksperiment je ponavljan tri puta.

3.10. Detekcija i kvantifikacija adherentnih ćelija (Crystal violet test)

Broj adherentnih ćelija određivan je Crystal violet testom (Sigma, St Louis, MO, USA). Nakon kultivacije kao što je opisano za MTT test, ćelije su prane, sušene i fiksirane ledeno hladnim aceton-metanolom, 10 min. Zatim su bojene sa 50 µl 0.05% rastvora boje Crystal violet u 25% metanolu tokom 10 min. Višak boje je uklanjan uranjanjem ploče u vodu, a zatim je ploča sušena na sobnoj temperaturi. Inkorporirana boja je rastvarana sa 100µl/bazenu 0.1 M Na-citrata u 50% etanolu. Optička gustina je merena na 540 nm, a intenzitet bojenja je bio proporcionalan broju adherentnih ćelija. Eksperiment je ponavljan tri puta.

3.11. SDS poliakrilamidna gel elektroforeza i Western blot

Za detekciju prolaktinskog receptora, HTR-8/SVneo i izolovane trofoblastne ćelije su lizirane u puferu za uzorke koji je sadržao 0.125 M Tris-HCl sa 4% SDS, 20% glicerol, 0.1% bromfenol plavo, 10% 2-merkaptioetanol i inhibitore proteaza i kuvane 5 min. Da bi se blokirale sulfhidrilne grupe uzorci su tretirani jodacetamidom (20 mg/ml), 15 min na sobnoj temperaturi i zatim centrifugirani na 17000g kako bi se uklonio nerastvoreni materijal. Za detekciju subjedinića integrina i gal-1 HTR-8/SVneo ćelije su lizirane u puferu za uzorke koji sadrži 0.125 M Tris-HCl sa 4% SDS, 20% glicerol, 0.1% bromfenol plavo, 10% 2-merkaptioetanol i inhibitore proteaza, kuvane 5 min, a zatim centrifugirane na 17000g kako bi se uklonio nerastvorni materijal. Lizati su razdvajani u 7.5 % poliakrilamidnom gelu za α_1 i PRLR, 10% gelu za α_5 i 12.5% gelu za gal-1, u redukujućim uslovima u sistemu Mini/PROTEAN[®] 3 Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA,

USA), pri parametrima: 150V, 80mA, 12W. Proteini razdvojeni elektroforezom 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 1% rastvorom kazeina u PBS, 2 sata na sobnoj temperaturi.

Membrane su nakon Western blot inkubirane sa antitelima na PRLR, integrin α_1 , integrin α_5 , gal-1 i aktin (kontrola), u razblaženjima navedenim u **Tabeli I**, uz stalno mešanje preko noći na 4 °C. Nakon ispiranja membrane su inkubirane sa odgovarajućim biotiniziranim sekundarnim antitelima, 30 min na sobnoj temperaturi, zatim ispirane i inkubirane ABC reagensom, 30 min. Vezivanje je detektovano hemiluminiscentnim kit (Pierce, SAD) ili upotrebom DAB/Ni kao hromogena.

Intenzitet dobijenih traka je upoređivan nakon denzitometrijske analize pomoću ImageMaster TotalLab v2.01 programa (Amersham Biosciences, NJ, USA). Rezultati su normalizivani na intenzitet trake za β -aktin. Eksperiment je ponavljan šest puta.

3.12. Zimografsko određivanje aktivnosti enzima

Želatinazna aktivnost metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9 u osnovnom kondicioniranom medijumu HTR-8/SVneo ćelija je utvrđivana pomoću SDS-PAGE zimografije po prethodno opisanoj proceduri (Lash i sar., 2005). Uzorci su razdvajani u 11% gelu koji je sadržao 1 mg/ml želatina, u neredukujućim uslovima. Kondicionirani medijumi razblaživani puferom za uzorke bez β -merkaptetanola (4:1) nanošeni su sa po 25 μ g proteina po bunaru. Nakon elektroforeze, gelovi su ispirani prvo dva puta po 15 min kako bi se uklonio SDS, a zatim pet puta u dH₂O i inkubirani preko noći na 37 °C u reakcionom puferu (50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 7). Nakon inkubacije, gelovi su bojeni CBB 30 min i odbojavani u 30% metanolu sa 10% glacijalnom sirćetnom kiselinom. Proteazna aktivnost se uočavala kao providna traka razloženog želatina na mestu lokalizacije želatinaza u gelu. Aktivnost je određivana semikvantitativno

denzitometrijskom analizom zimograma pomoću ImageMaster TotalLab v2.01 programa (Amersham Biosciences, NJ, USA).

3.13. Statistička analiza

Dobijeni podaci su statistički obrađeni u programu Statistical Software Program Version 5.0 (Primer of Biostatistic, McGraw-Hill Companies Inc., New Jersey, SAD) upotrebom Studentovog t-testa. P vrednosti manje od 0.05 su smatrane statistički značajnim.

REZULTATI

4.1. Prolaktin

U dostupnoj literaturi postoje podaci o ulozi prolaktina u različitim fiziološkim i patološkim procesima. Međutim, podaci o biološkoj ulozi prolaktina u trofoblastu su veoma retki. Poznato je da prolaktin u različitim ćelijama i tkivima utiče na ekspresiju adhezivnih i proteolitičkih molekula, značajnih za razgradnju komponenti vanćelijskog matriksa i ćelijsku migraciju, što bi moglo biti relevantno za invaziju trofoblasta i implantaciju embriona.

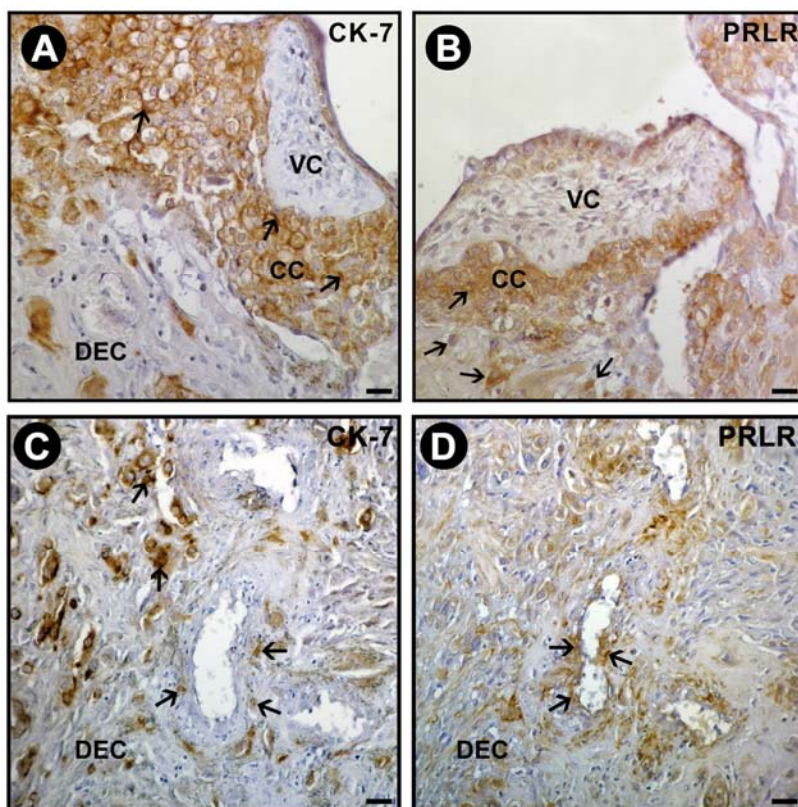
Nedovoljno podataka o prisustvu prolaktinskog receptora na citotrofoblastnim ćelijama prvog trimestra, kao i vremenskom obrascu i tačnom mestu ekspresije različitih formi receptora i njihove potencijalne uloge u trudnoći predstavlja otežavajuću okolnost za razumevanje biološke uloge decidualnog prolaktina u ranoj trudnoći. Pored toga, razumevanje biološkog efekta prolaktina *in vivo* otežava i činjenica da se za prolaktinski receptor vezuju tri tipa liganada: prolaktin, placentni laktogen i hormon rasta.

Imajući u vidu gore navedeno, ovim radom po prvi put je ispitano prisustvo različitih izoformi prolaktinskog receptora na citotrofoblastnim ćelijama prvog trimestra normalne trudnoće sa ciljem da se utvrdi da li bi prolaktin i prisustvo prolaktinskog receptora na ekstravilusnim citotrofoblastnim ćelijama mogli biti značajni za implantaciju embriona.

4.1.1. Ekspresija PRLR u tkivu placentnog ležišta prvog trimestra

Imunohistohemijsko ispitivanje ekspresije PRLR vršeno je na parafinskim presecima tkiva placentnog ležišta prvog trimestra. Na **slici 16A i B** uočava se vilusno jezgro (engl. villous core – VC), ćelijski stub sidreće resice (engl. cell column - CC) i tkivo decidue (DEC), dok je na slici **16C i D** prikazano decidualno tkivo sa vidljivim intersticijskim trofoblastom. U cilju identifikacije trofoblastnih ćelija parafinski preseki su bojani antitelima na CK-7 koji predstavlja marker citotrofoblastnih ćelija (**Slika 16A, C**).

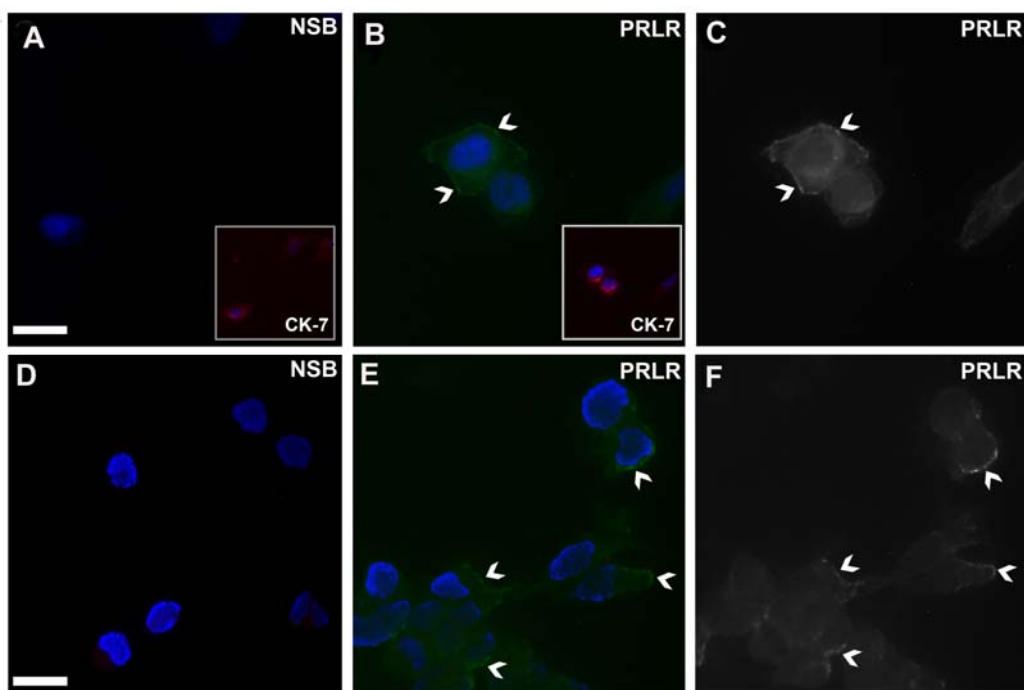
Strelicama na **slici 16A i C** označene su CK-7-pozitivne ćelije trofoblasta u ćelijskom stubu sidreće resice (**Slika 16A**), i intersticijalne trofoblastne ćelije (**Slika 16C**). Strelice na **slici 16B i D** pokazuju prisustvo PRLR u ćelijskom stubu i intersticijalnim trofoblastnim ćelijama (**Slika 16B**) i u perivaskularnim trofoblastnim ćelijama (**Slika 16D**). Citotrofoblastne ćelije u ćelijskim stubovima sidreće resice su bile intenzivno obojene, što odgovara većoj ekspresiji PRLR, dok je invazivni ekstravilusni citotrofoblast bio slabije obojen, a vilusna stroma neobojena (**Slika 16B**). Takođe, PRLR je lokalizovan i u sinciciotrofoblastu (**Slika 16B**), a veoma slabo u perivaskularnim trofoblastnim ćelijama (**Slika 16D**).



Slika 16. Ekspresija prolaktinskog receptora u tkivu placentnog ležišta prvog trimestra (B, D). Identitet citotrofoblasta u tkivu placente je utvrđen bojenjem na CK-7, marker trofoblastnih ćelija, što je predstavljeno strelicama (A, C). Na panelu B strelice pokazuju prisustvo PRLR u ćelijskom stubu sidreće resice i intersticijalnim trofoblastnim ćelijama, dok na panelu D strelice pokazuju prisustvo PRLR u perivaskularnim trofoblastnim ćelijama. VC - vilusno jezgro, CC – ćelijski stub, DEC – decidualne ćelije. Veličina podeoka 20 μ m.

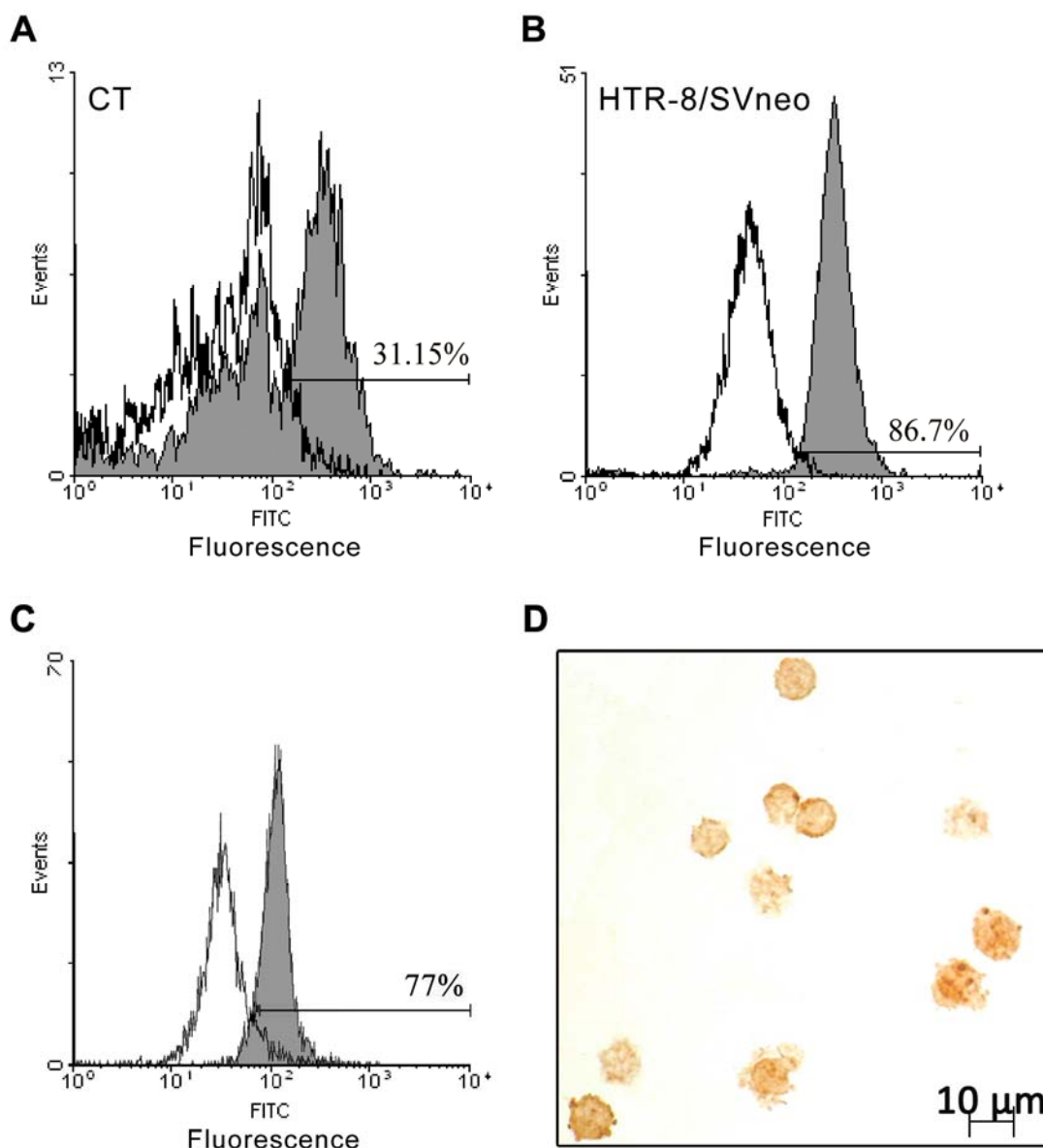
4.2. Ekspresija PRLR na izolovanim citotrofoblastnim i HTR-8/SVneo ćelijama

Imunocitohemijom utvrđeno je da izolovani citotrofoblast (Slika 17B, C), kao i HTR-8/SVneo ćelijska linija (Slika 17E, F) ispoljavaju PRLR. Kao što je već pomenuto u poglavlju Materijal i metode, HTR-8/SVneo ćelijska linija nastala je transfekcijom ekstravilusnih ćelija humane placente prvog trimestra trudnoće SV40 antigenom i ekspirira markere invazivnih ekstravilusnih ćelija. Izolovane citotrofoblastne ćelije su dvostruko bojene, i to antitelom na CK-7 u cilju njihove identifikacije, jer je CK-7 marker citotrofoblastnih ćelija (Slika 17A, B umeci), i antitelom na PRLR (Slika 17B, C). U oba tipa trofoblastnih ćelija detektovano je bojenje na PRLR unutar ćelija i na ćelijskoj membrani. Nespecifično bojenje bilo je nezatno ili potpuno odsutno (Slika 17A, D).



Slika 17. Imunolokalizacija PRLR u izolovanim citotrofoblastnim ćelijama placente prvog trimestra (A, B, C) i HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji (D, E, F). Citotrofoblastne ćelije su dvostruko bojene, antitelom na CK-7, markerom citotrofoblasta (A, B, umeci), i antitelom na PRLR. Vrhovi strelica pokazuju prisustvo PRLR na membrani ćelija, kao i u citoplazmi izolovanih trofoblasta (B, C) i HTR-8/SVneo ćelija (E, F). C i F predstavljaju originalne slike napravljene monohromatskom kamerom, koje odgovaraju slikama B i E. Nespecifično vezivanje – NSB je predstavljeno na panelu A i D. Veličina podeoka 20 μ m.

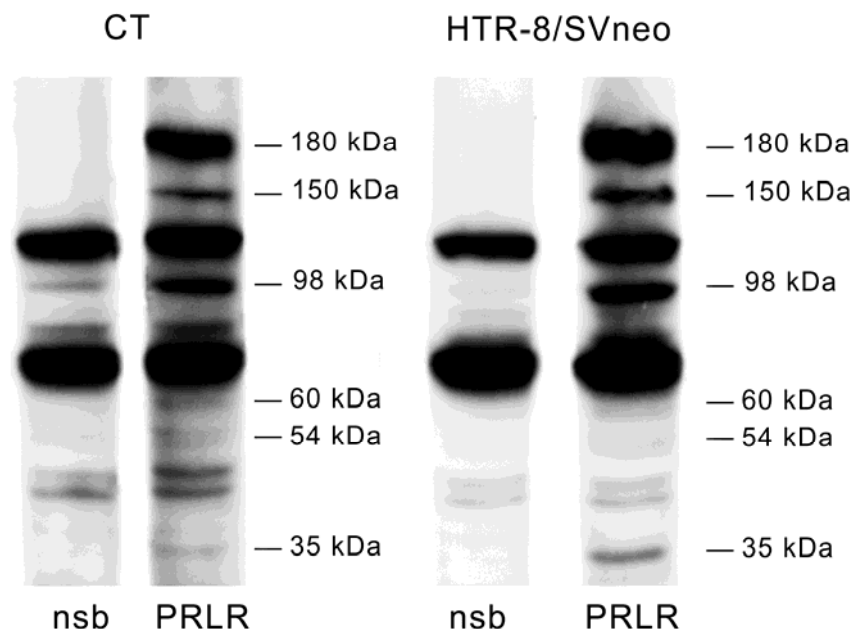
Ekspresija PRLR je detektovana i na izolovanim citotrofoblastnim i HTR-8/SVneo ćelijama protočnom citofluorimetrijom. Dobijeni rezultati pokazuju da 31% izolovanih CT (**Slika 18A**) i 86% HTR-8/SVneo ćelija (**Slika 18B**) ispoljava PRLR. Kao pozitivna kontrola korišćeni su limfociti izolovani iz periferne krvi dobrovoljnih davaoca, pri čemu je 77% ćelija ispoljavalo ovaj receptor (**Slika 18C**), a ekspresija je potvrđena i imunocitohemijski (**Slika 18D**).



Slika 18. Analiza ekspresije PRLR na citotrofoblastima (A), HTR-8/SVneo ćelijama (B) i limfocitima (C i D). Prikazani histogrami (A-C) predstavljaju rezultate citofluorimetrijske analize. Kvantifikacija ekspresije PRLR je izvršena unutar graničnika (horizontalna linija) definisanih na osnovu pozicija histograma specifične (sivi histogram) i nespecifične (beli histogram) imunofluorescencije. Procenat PRLR-pozitivnih ćelija je naveden u svakom histogramu. Panel D pokazuje ekspresiju PRLR u citoplazmi i na membrani limfocita (pozitivna kontrola), koja je vizualizovana primenom postupka imunoenzimskog obeležavanja ćelija.

4.3. Prisustvo različitih izoformi prolaktinskog receptora na izolovanom citotrofoblastu i HTR-8/SVneo ćelijama

Prisustvo više različitih izoformi PRLR detektovano je Western blot analizom ćelijskih lizata oba ispitivana tipa ćelija. Specifične trake molekulskih masa od 160-180 kDa, 135-150 kDa, 90-98 kDa, 60-67 kDa, 45-55 kDa i 30-40 kDa dobijene su korišćenjem antitela koja prepoznaju zajednički vanćelijski domen (**Slika 19**). Sem dve trake najvećih molekulskih masa, sve druge specifične trake odgovaraju masama koje su poznate kod drugih vrsta ćelija, pri čemu forma od 90-98 kDa predstavlja monomernu dugu formu receptora, forma od 60-67 kDa mogla bi da predstavlja $\Delta S1$ formu, 45-55 kDa intermedijarnu, dok bi forma od 30-40 kDa mogla da predstavlja PRL-vezujući protein ili S1b kratku formu receptora. U analiziranim ćelijskim lizatima oba tipa ćelija, prisutne su i forme velike molekulske mase od 160-180 kDa i 135-150 kDa, od kojih bi veća mogla da predstavlja dimer duge forme receptora za koji je pokazano da ima masu od oko 180 kDa, dok bi manja mogla biti neki heterodimer ili diferencijalno glikozilovani oblik receptora. Ove forme receptora dobijene su pod redukujućim i neredukujućim uslovima. Prisustvo ovih formi može biti rezultat nepotpune redukcije ćelijskih lizata, a takođe postoji i mogućnost da su ove trake rezultat stvaranja agregata sa drugim proteinima, uz poznate različite forme diferencijalno glikozilovanih receptorskih proteina.



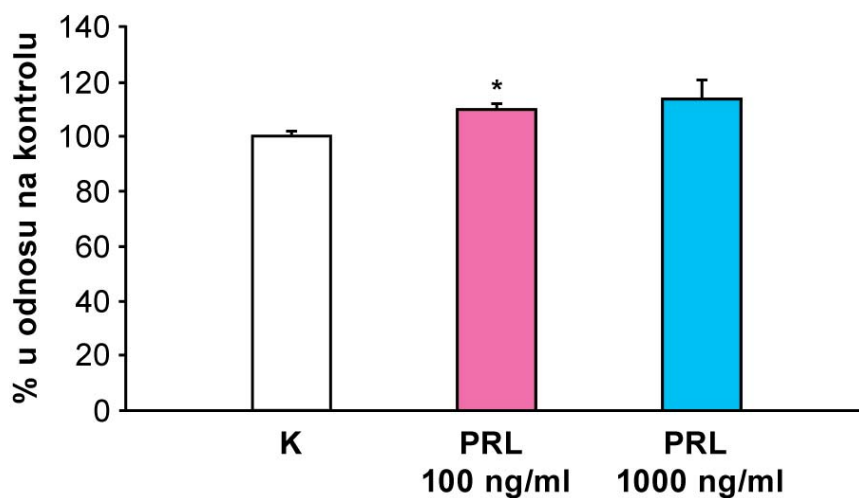
Slika 19. Ekspresija molekularnih izoformi PRLR u izolovanom CT (levo) i HTR-8/SVneo (desno) ćelijskim lizatima. Membrane sa imobilisanim proteinima su inkubirane sa anti-PRLR antitelima i vizualizovane hemiluminiscencom. Vrhovi strelica pokazuju prisustvo različitih izoformi PRLR. NSB – nespecifično vezano sekundarno antitelo.

4.4. Uticaj prolaktina na funkcionalna svojstva trofoblasta *in vitro*

Nakon ispitivanja ekspresije PRLR i identifikacije njegovih eksprimiranih formi, drugu celinu našeg istraživanja činilo je ispitivanje mogućeg modulatornog efekta PRL na funkciju trofoblasta. Polazeći od rezultata preliminarnih ispitivanja uticaja različitih koncentracija PRL (1, 10, 100, 400 i 1000 ng/ml) na ćelijsku invaziju, ustanovili smo da su koncentracije veće od 100 ng/ml efektivne. U daljim eksperimentima primenjivane su koncentracije od 100 ng/ml i 1000 ng/ml. Ispitivan je efekat PRL na vijabilnost, broj adherentnih ćelija i apoptozu. Pored toga, ispitivan je mogući značaj PRL za procese ćelijske adhezije, migracije i invazije, korišćenjem funkcionalnih testova *in vitro*.

4.4.1. Efekat prolaktina na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija

Poznato je da PRL utiče na vijabilnost i proliferaciju različitih tipova ćelija, ali ne i na preživljavanje i proliferaciju ćelija trofoblasta. HTR-8/SVneo ćelije su inkubirane bez (kontrola) i sa različitim koncentracijama PRL (100 ng/ml i 1000 ng/ml), a ćelijska vijabilnost je određivana MTT testom. Dobijeni rezultati pokazuju da obe koncentracije PRL blago povećavaju ćelijsku vijabilnost, ali je samo tretman PRL od 100 ng/ml imao statistički značajan efekat. Koncentracija PRL od 100 ng/ml je za 9% povećala vijabilnost ćelija u odnosu na kontrolu (SEM \pm 1.5; $p < 0.05$), dok je blago povećanje ćelijske vijabilnosti nakon inkubacije sa PRL od 1000 ng/ml bilo neznačajno (13%; SEM \pm 6.2) (Slika 20).

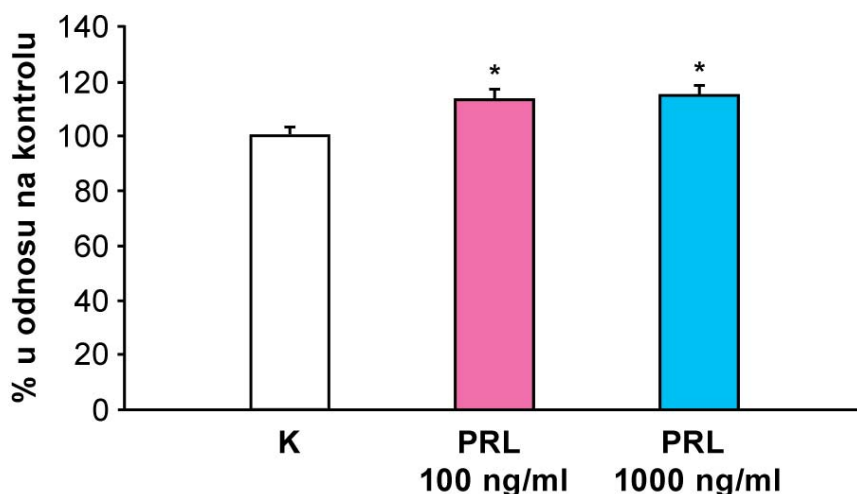


Slika 20. Efekat prolaktina (100 ng/ml i 1000 ng/ml) na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija. Dobijene vrednosti koje predstavljaju srednju vrednost absorbance na 540 nm \pm SEM izražene su kao procenat kontrole. Statistički značajna razlika između kontrole i tretmana za $p < 0.05$ označena je sa *.

4.4.2. Uticaj prolaktina na broj adherentnih ćelija

Uticaj PRL na broj adherentnih HTR-8/SVneo ćelija ispitivali smo Crystal violet testom. Dobijeni rezultati nakon 24 sata kultivacije ćelija bez (kontrola) i u prisustvu dve

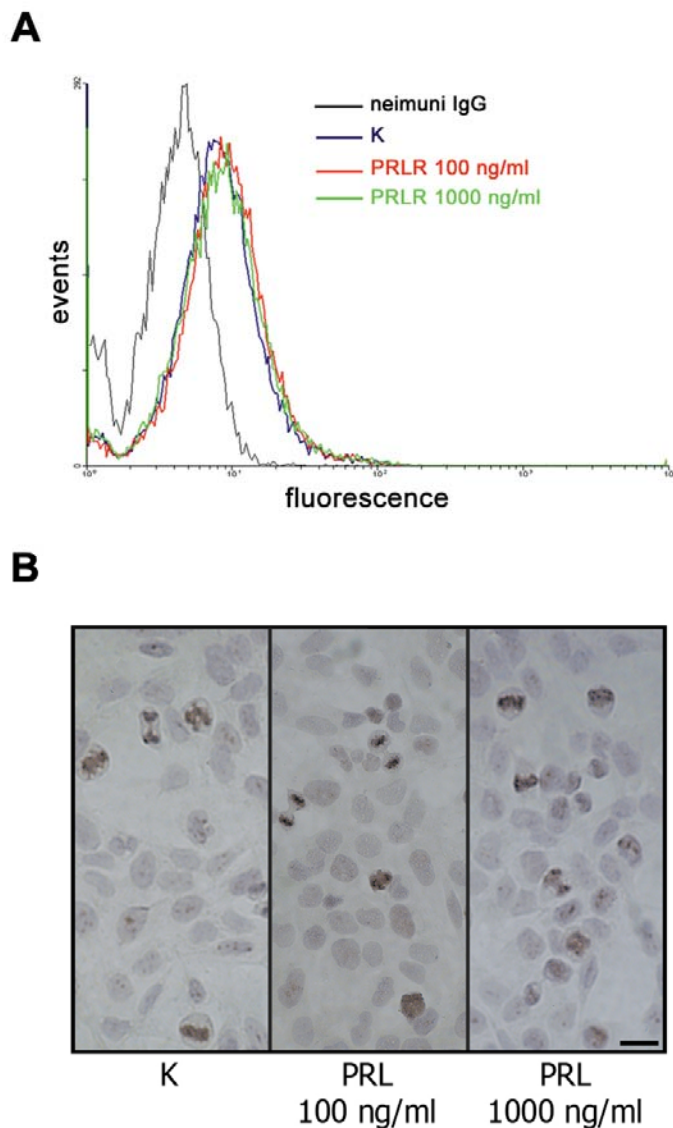
različite koncentracije PRL (100 ng/ml i 1000 ng/ml) pokazuju blago povećanje broja adherentnih ćelija u odnosu na kontrolnu vrednost. Kultivacija sa 100 ng/ml povećala je broj adherentnih ćelija za 13% (SEM \pm 3.3; $p < 0.05$), a kultivacija sa 1000 ng/ml za 15% (SEM \pm 2.8; $p < 0.05$) u poređenju sa kontrolnom vrednošću (**Slika 21**).



Slika 21. Efekat prolaktina (100 ng/ml i 1000 ng/ml) na broj adherentnih HTR-8/SVneo ćelija. Dobijene vrednosti absorbance na 540 nm koja je srazmerna broju ćelija \pm SEM izražene su kao procenat kontrole. * označava statistički značajne razlike između kontrole i tretmana za $p < 0.05$.

4.4.3. Efekat prolaktina na proliferaciju HTR-8/SVneo ćelija

Obzirom da je uočeno blago povećanje vijabilnosti i broja adherentnih ćelija pod uticajem PRL, želeli smo da ispitamo da li PRL utiče na proliferaciju HTR-8/SVneo ćelija. Ispitivan je uticaj PRL na ekspresiju Ki67 markera ćelijske proliferacije nakon kultivacije ćelija bez (kontrola) i u prisustvu PRL (100 ng/ml i 1000 ng/ml) u trajanju od 24 sata, protočnom citofluorimetrijom (**Slika 22A**) i imunocitohemijom (**Slika 22B**). U kontrolnim HTR-8/SVneo ćelijama procenat Ki67-pozitivnih ćelija je bio 26%, dok je u tretmanu HTR-8/SVneo ćelija PRL od 100 ng/ml iznosio 32%, a u tretmanu PRL od 1000 ng/ml 30% (**Slika 22A**). Slični rezultati su dobijeni primenom imunocitohemijske metode detekcije Ki67 markera.

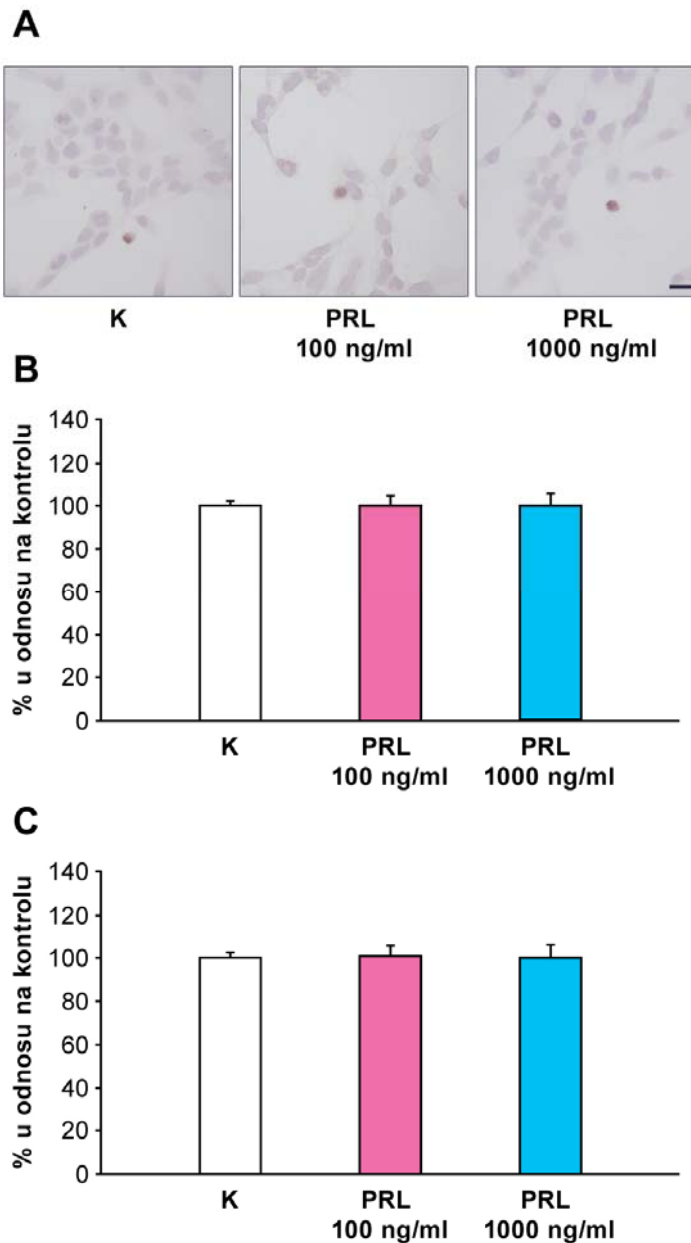


Slika 22. Uticaj PRL na ekspresiju Ki67 markera proliferacije ispitivan citofluorimetrijski (A) i imunocitohemijski (B). Na panelu **A** prikazan je histogram fluorescence HTR-8/SVneo ćelija obeleženih anti-Ki67 antitelima nakon kultivacije od 24 sata. Plavi histogram predstavlja Ki67-pozitivne kontrolne ćelije, crveni histogram predstavlja Ki67-pozitivne ćelije tretirane PRL od 100 ng/ml, a zeleni histogram predstavlja Ki67-pozitivne ćelije pri tretmanu PRL od 1000 ng/ml. Sivi histogram predstavlja ne-imuni IgG. Na panelu **B** predstavljena je imuno-enzimska detekcija ekspresije Ki67 markera proliferacije u kulturama kontrolnih (K) HTR-8/SVneo ćelija i HTR-8/SVneo ćelija tretiranih različitim koncentracijama prolaktina (100 ng/ml i 1000 ng/ml). Broj Ki67-pozitivnih ćelija bio je približno jednak u kontrolnim i ćelijama tretiranim PRL. Veličina podeoka 20 μ m.

4.4.4. Uticaj prolaktina na apoptozu HTR-8/SVneo ćelija

Apoptoza HTR-8/SVneo ćelija ispitivana je u kulturi ćelija imunocitohemijskom metodom i protočnom citofluorimetrijom. Ćelije su gajene bez (kontrola) i u prisustvu PRL (100 ng/ml i 1000 ng/ml) i nakon kultivacije od 24 sata procenjivana je ekspresija M30 markera apoptoze, koji predstavlja fragment citokeratina-18, a koji nastaje delovanjem kaspaza (**Slika 23A, B, C**). Primenom imunocitohemije ustanovili smo da je procenat apoptotičnih ćelija bio manji od 2% i nije bio značajno promenjen pod uticajem tretmana prolaktinom (100 ng/ml i 1000 ng/ml) (**Slika 23D**). Kada je apoptoza merena protočnom citofluorimetrijom tretman prolaktinom takođe nije imao značajan uticaj na apoptozu HTR-8/SVneo ćelija (**Slika 23E**).

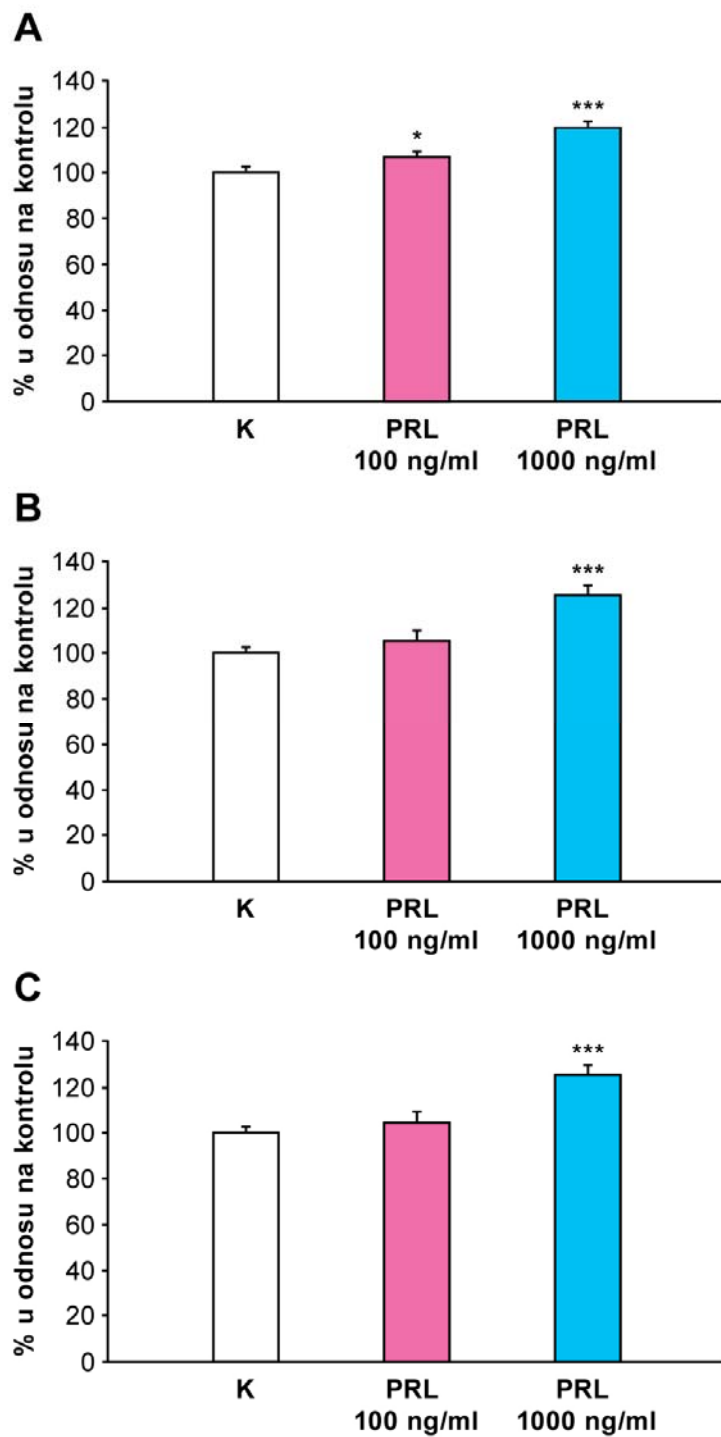
Uticaj PRL na apoptozu HTR-8/SVneo ćelija



Slika 23. Uticaj PRL na apoptozu HTR-8/SVneo ćelija. Imunoenzimska detekcija ekspresije M30 markera u kulturi HTR-8/SVneo ćelija (A). Analiza apoptoze HTR-8/SVneo ćelija na osnovu ekspresije M30 markera (B) i obeležavanja ćelija PI (C). HTR-8/SVneo ćelije su kultivisane 24 sata u kontrolnom medijumu i u prisustvu različitih koncentracija PRL. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost broja M30⁺ ćelija ± SEM (B) ili srednju vrednost procenta PI⁺ apoptotočnih ćelija ± SEM (C) i izražene su kao procenat kontrole.

4.4.5. Uticaj prolaktina na adheziju HTR-8/SVneo ćelija

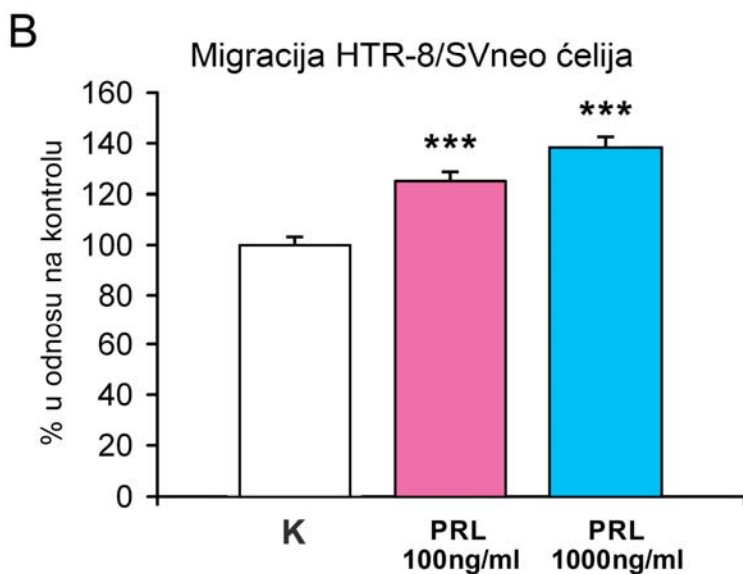
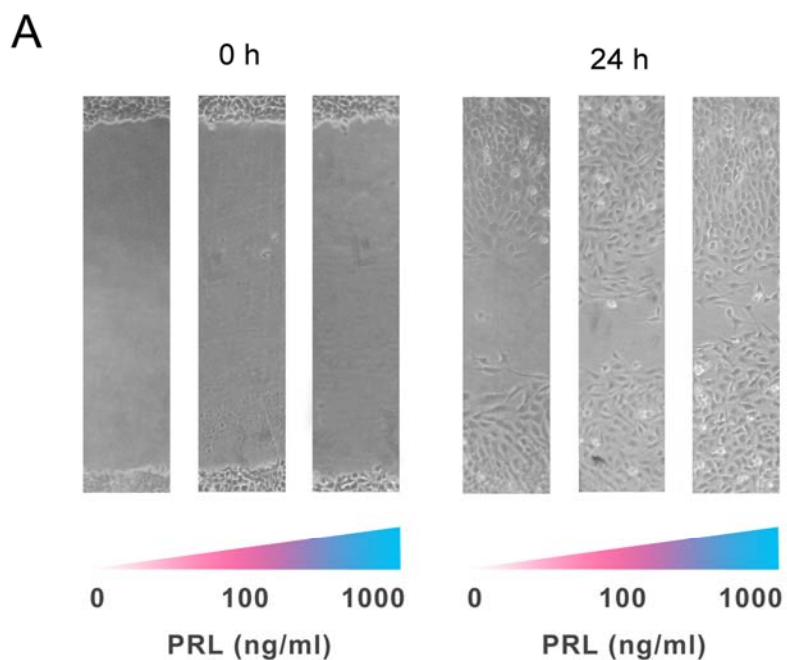
Ispitivan je uticaj različitih koncentracija PRL (100 ng/ml i 1000 ng/ml) na adheziju HTR-8/SVneo ćelija (**Slika 24**). Ćelije su kultivisane bez (kontrola) i u prisustvu PRL. Praćena je adhezija na plastici i u bunarima obloženim kolagenom i Matrigelom. Tretman HTR-8/SVneo ćelija prolaktinom koncentracije 100 ng/ml značajno je povećao njihovu adheziju na plastici za 7% (SEM \pm 1.6; $p < 0.05$), a koncentracija 1000 ng/ml za 19% (SEM \pm 1.9; $p < 0.001$) u odnosu na kontrolu. Adhezija na bunarima obloženim kolagenom i Matrigelom značajno je bila povišena samo nakon tretmana većim koncentracijama PRL (1000 ng/ml) i to 25 % (SEM \pm 3.5; $p < 0.001$) u oba slučaja.



Slika 24. Uticaj PRL (100 ng/ml i 1000 ng/ml) na adheziju HTR-8/SVneo ćelija za plastiku (A), kolagen (B) i Matrigel (C). Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost absorbance \pm SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu. * označava statistički značajne razlike između kontrole i tretmana za $p < 0.05$ i *** za $p < 0.001$.

4.4.6. Uticaj prolaktina na migraciju HTR-8/SVneo ćelija

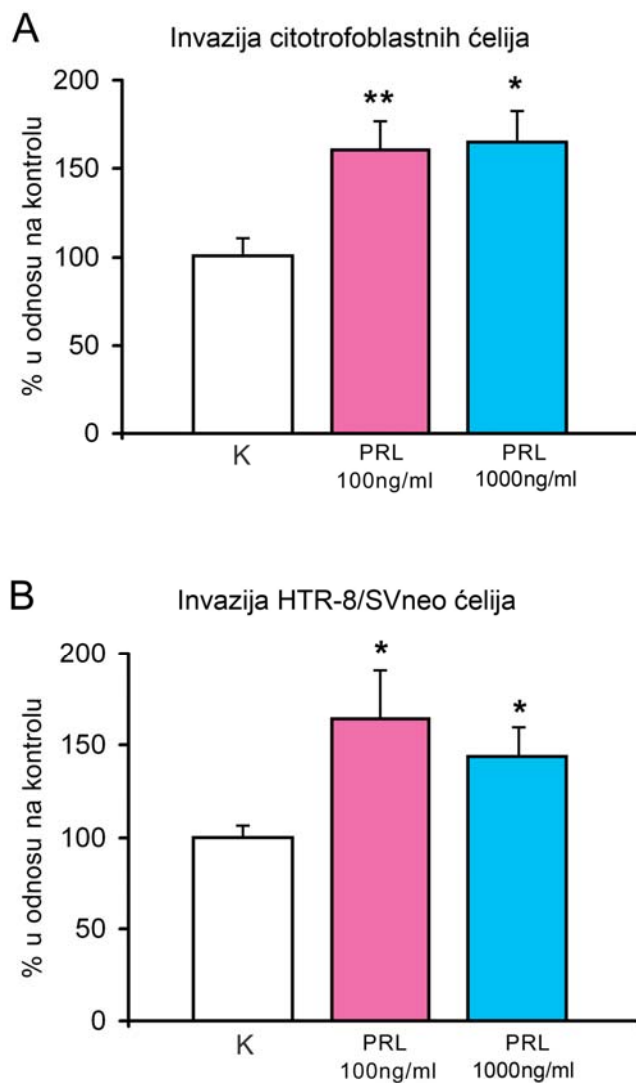
U testu migracije *in vitro* metodom "Wound healing" ispitivano je da li se migracija HTR-8/SVneo ćelija menja pod uticajem PRL. Pređeni put migratornih ćelija utvrđen je korišćenjem elektronske mreže. U eksperimentu je poreden pređeni put HTR-8/SVneo ćelija posle ozleđivanja monolejera u tretmanu (PRL 100 ng/ml i 1000 ng/ml) sa onim u kontroli (bez PRL) (**Slika 25A**). Dobijeni rezultati nakon 24 sata migracije, pokazuju da je PRL pri koncentraciji od 100 ng/ml i 1000 ng/ml imao stimulatorni efekat na HTR-8/SVneo ćelijsku migraciju, i to za 25% (SEM \pm 3.7; $p < 0.001$), i 38% u odnosu na kontrolu (SEM \pm 4.2; $p < 0.001$; **Slika 25B**).



Slika 25. Migracija HTR-8/SVneo ćelija u „Wound healing“ testu (A). Efekat PRL na migraciju HTR-8/SVneo ćelija posle 24 sata kultivacije (B). Na slici u okviru panela **A** prikazana su odabrana mesta u kontrolnim i tretiranim uzorcima u početnom trenutku (levo) i nakon 24 sata ćelijske migracije (desno). Vrednosti dobijene merenjem pređenog puta predstavljaju srednju vrednost \pm SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu. Statistički značajne razlike između kontrole i tretmana su pokazane kao *** za $p < 0.001$.

4.4.7. Uticaj prolaktina na invaziju ekstravilusnih trofoblastnih i HTR-8/SVneo ćelija

Uticaj PRL na invaziju izolovanih trofoblastnih i HTR-8/SVneo ćelija ispitivan je korišćenjem *in vitro* metode invazije Matrigela koju su opisali Librach i saradnici (1991). Ćelije su inkubirane 24 sata bez (kontrola) i sa PRL (100 ng/ml i 1000 ng/ml). Obe koncentracije značajno stimulišu invaziju oba tipa ćelija. PRL u koncentraciji od 100 ng/ml za 60% (SEM \pm 17.0; $p < 0.01$) povećava invaziju izolovanih citotrofoblastnih ćelija, a za 64% (SEM \pm 26.3; $p < 0.05$) HTR-8/SVneo ćelija, dok koncentracija PRL od 1000 ng/ml povećava invaziju citotrofoblastnih ćelija za 65% (SEM \pm 17.6; $p < 0.05$), a HTR-8/SVneo ćelija za 44% (SEM \pm 15.3; $p < 0.05$) u odnosu na kontrolne ćelije (**Slika 26A, B**).



Slika 26. Efekat PRL na invaziju izolovanih trofoblasta (A) i HTR-8/SVneo ćelija (B). Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost broja zauzetih pora \pm SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu. Statistički značajne razlike između kontrole i tretmana su pokazane kao * za $p < 0.05$ i ** za $p < 0.01$.

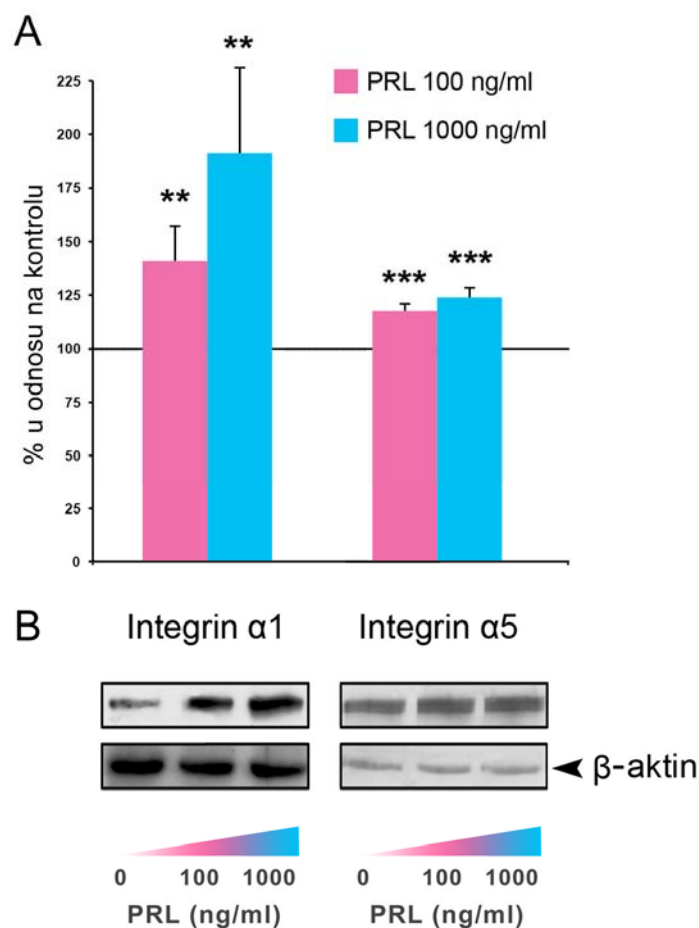
4.5. Uticaj prolaktina na proteine od značaja za invaziju trofoblasta

U trofoblastnim ćelijama koje vrše invaziju zida uterusa menja se ekspresija proteina i dolazi do ispoljavanja molekula značajnih za ovaj proces. Pokazano je da su $\alpha_1\beta_1$ i $\alpha_5\beta_1$ integrini, gal-1 i matriksne metaloproteinaze, MMP-2 i MMP-9, posebno značajni za ovaj proces.

Na osnovu dobijenog stimulatornog efekta PRL na migraciju i invaziju trofoblasta, pretpostavili smo da neki od ovih molekuli mogu biti posrednici u ovim procesima.

4.5.1. Uticaj prolaktina na ekspresiju α_1 i α_5 subjedinica integrina

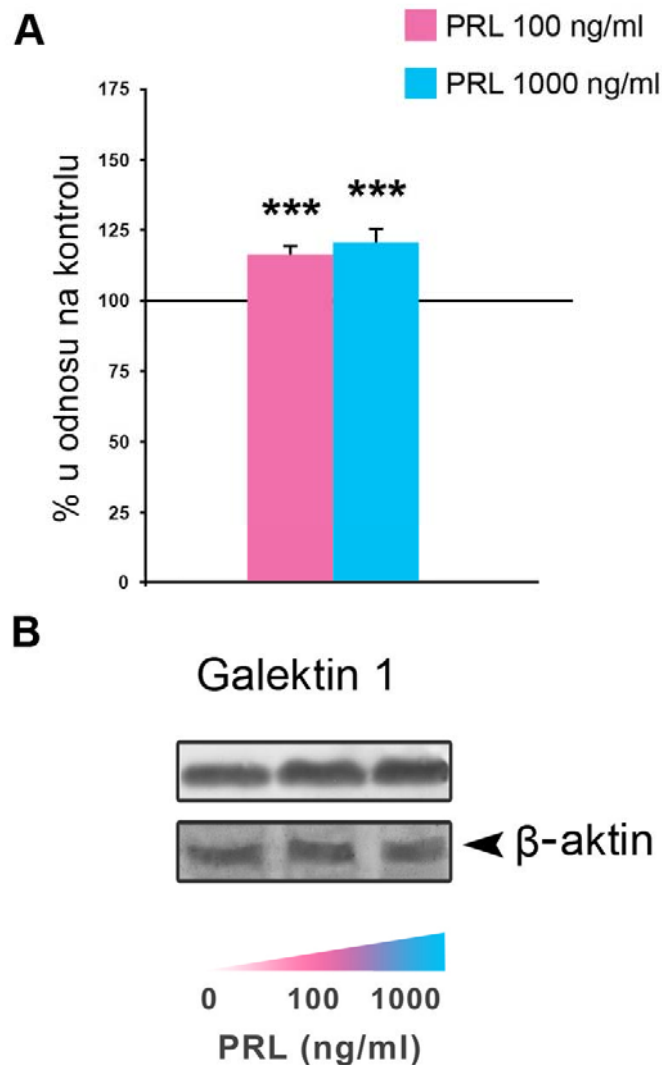
Uticaj PRL u koncentraciji od 100 ng/ml i 1000 ng/ml na ekspresiju α_1 i α_5 subjedinica integrina, kao potencijalnih efektornih molekula ispitivan je Western blot analizom lizata HTR-8/SVneo ćelija (**Slika 27B**). Intenzitet traka je kvantifikovan denzitometrijski (**Slika 27A**) i normalizovan u odnosu na aktin. Obe koncentracije PRL su povećale ekspresiju ovih subjedinica integrina. Nakon kultivacije od 24 sata sa i bez (kontrola) tretmana PRL, ekspresija integrina α_1 je bila povećana za 41% (SEM \pm 15.9; $p < 0.01$) i 91% (SEM \pm 38; $p < 0.01$) u odnosu na kontrolne ćelije, pri koncentraciji PRL od 100 ng/ml i 1000 ng/ml. Obe koncentracije PRL su u manjoj meri, ali značajno, povećale ekspresiju α_5 subjedinice integrina i to za 18% (SEM \pm 3.3; $p < 0.001$) i 24% (SEM \pm 4.5; $p < 0.001$) u odnosu na kontrolu.



Slika 27. Uticaj PRL na ekspresiju subjedinica integrina α_1 i α_5 u Western blot analizi (B). Dobijeni rezultati su prikazani kao srednja vrednost intenziteta normalizovanog na aktin \pm SEM i izraženi kao procenat u odnosu na kontrolu (A). ** za $p < 0.01$ i *** za $p < 0.001$ predstavljaju statistički značajne razlike između kontrole i tretmana.

4.5.2. Uticaj prolaktina na ekspresiju gal-1

Uticaj PRL na ekspresiju gal-1 ispitivan je u ćelijskim lizatima HTR-8/SVneo ćelija. Rezultati dobijeni Western blot analizom (Slika 28B) pokazuju da su obe koncentracije PRL (100 ng/ml i 1000 ng/ml) umereno, ali značajno povećale ekspresiju gal-1 i to za 16% (SEM \pm 2.3; $p < 0.001$) nakon tretmana prolaktinom od 100 ng/ml, odnosno 21% (SEM \pm 3.8; $p < 0.001$) nakon tretmana prolaktinom od 1000 ng/ml u odnosu na kontrolu (Slika 28A). Intenzitet traka je kvantifikovan denzitometrijski, i normalizovan u odnosu na aktin.

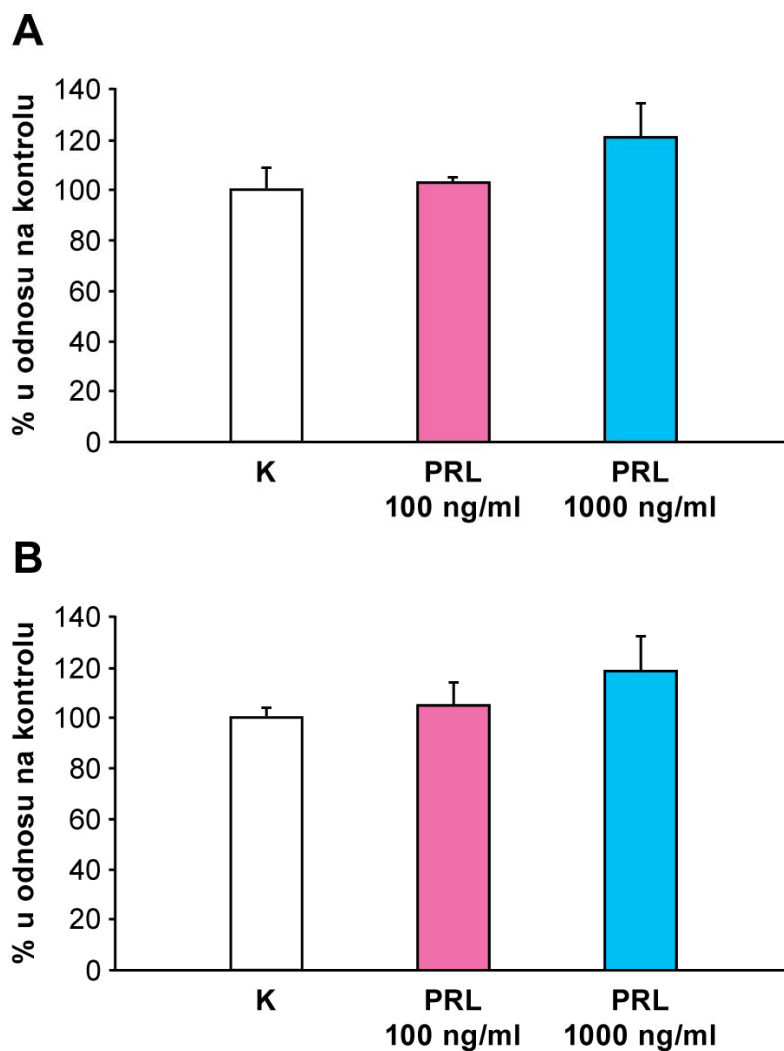


Slika 28. Uticaj PRL na ekspresiju gal-1 u Western blot analizi (B). Grafikon A predstavlja rezultat denzitometrijske analize. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost intenziteta dobijenih traka normalizovanih u odnosu na aktin \pm SEM i izraženi kao procenat u odnosu na kontrolu. *** za $p < 0.001$ predstavlja statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana.

4.5.3. Uticaj prolaktina na aktivnost MMP-2 i MMP-9

Uticaj različitih koncentracija prolaktina (100 ng/ml i 1000 ng/ml) na aktivnost matriksnih metaloproteinaza -2 i -9 ispitivan je u supernatantima HTR-8/SVneo ćelija, metodom zimografije (Slika 29). Ćelije su kultivisane bez (kontrola) i sa PRL. Dobijeni

rezultati pokazuju da je PRL blago povećao aktivnost obe metaloproteinaze i to pri koncentraciji od 1000 ng/ml. Koncentracija PRL od 1000 ng/ml povećala je aktivnost MMP-2 za 20% (SEM \pm 12.9) i 18% (SEM \pm 13.1) u odnosu na kontrolu kada je merena aktivnost MMP-9, ali dobijene razlike nisu statistički značajne. Koncentracija PRL od 100 ng/ml nije imala efekat na aktivnost MMP-2 i MMP-9. Intenziteti traka na zimogramu su kvantifikovani denzitometrijski.



Slika 29. Uticaj PRL na želatinolitičku aktivnost MMP-2 (A) i MMP-9 (B). Grafikoni predstavljaju rezultat denzitometrijske analize. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost intenziteta \pm SEM, i izraženi kao procenat kontrole.

DISKUSIJA

Implantacija embriona iziskuje specifične i visoko koordinisane interakcije u kojima učestvuju i embrion i endometrijum. Smatra se da bi neki od produkata blastociste ili endometrijuma mogao da inicira ranu komunikaciju embriona i uterusa, i da omogućí njihovu dalju interakciju u toku trudnoće (Lessey, 2000). Pretpostavlja se da bi hormoni, citokini ili faktori rasta sekretovani od strane endometrijuma mogli imati značajnu ulogu u uspostavljanju trudnoće, ranom embrionalnom razvoju, implantaciji i uspešnom odvijanju trudnoće do porođaja (Hunt, 1989; Giudice, 1999). Funkcija endometrijuma *in vivo* je regulisana kompleksnom interakcijom različitih tipova ćelija, lokalnih faktora rasta i hormona, uključujući PRL, estrogen i progesteron. Ovi faktori mogu pojačati ili inhibirati uzajamna dejstva različitim mehanizmima koji uključuju promenu ekspresije receptora, aktivaciju signalnih puteva i aktiviranje parakrinih modulatora produkovanih od strane različitih ćelijskih tipova.

Prolaktin je hormon koga luči hipofiza, ali i druga tkiva i ćelije (Ben-Jonathan i sar., 1996). Pored hipofize, i endometrijum sintetise i sekretuje prolaktin (Riddick i sar., 1978). Decidualne ćelije endometrijuma sintetisu PRL u kasnoj sekretornoj fazi menstrualnog ciklusa i tokom trudnoće. Obzirom da fiziološka uloga decidualnog PRL do danas nije dovoljno poznata, o ulozi ovog hormona/citokina u ranoj trudnoći postoji više pretpostavki. Jedna od pretpostavki je da lokalno produkovani prolaktin primarno deluje kao autokrini ili parakrini faktor regulacije ekspresije različitih molekula.

Paralelno sa procesom decidualizacije endometrijuma, dolazi i do akumulacije leukocita u stromi endometrijuma. Većinu endometrijalnih leukocita čine veliki granularni limfociti i makrofagi (Starkey et al., 1988; Bulmer, 1995). Smatra se da je njihovo prisustvo u ranoj trudnoći značajno za procese implantacije i placentacije (Pijnenborg, 2002). Decidualni PRL bi mogao imati ulogu u proliferaciji i/ili diferencijaciji velikih granularnih limfocita, a King i sar. (1989) su detektovali i prisustvo PRLR u ovim ćelijama. Jedna od pretpostavki je da se interakcijom velikih granularnih limfocita sa invazivnim trofoblastnim ćelijama ograničava invazija u zid uterusa, pa se smatra da je ova interakcija potrebna za uspešnu implantaciju (Klentzeris i sar., 1994). Pored toga, PRL može uticati i na produkciju hemokina značajnih za akumulaciju leukocita. Pokazano je da PRL u tkivu

jajnika stimuliše produkciju jednog takvog hemokina, monocitnog hemoatraktantnog proteina-1 (Bowen i sar., 1996).

Sa druge strane, pokazano je da u ranoj trudnoći razvoj placente zavisi od angiogenih i antiangiogenih faktora. Smatra se da bi intaktni molekul PRL od 23 kDa mogao da stimuliše, a proteolitički 16 kDa N-terminalni fragment da inhibira angiogenezu, tako da je jedna od pretpostavki da je uloga decidualnog PRL promocija razvoja krvnih sudova u placenti (Struman i sar., 1999; Jabbour i Critchley, 2001).

Lokalno produkovan PRL bi mogao da učestvuje u diferencijaciji decidualnih ćelija i pripremanju uterusa za moguću implantaciju embriona. Eyal i sar., (2007) su pokazali da PRL može imati inhibitorni efekat na diferencijaciju humanih uterušnih stromalnih ćelija. Sekretovani decidualni PRL autokrino inhibira proces decidualizacije. Neke od pretpostavljenih uloga endometrijalnog PRL bi mogle da budu i modifikacija imunske sredine endometrijuma, ili regulacija ekspresije faktora koje proizvode žlezdani i stromalni odeljak endometrijuma, a koji mogu učestvovati u kontroli proliferacije trofoblasta i invaziji endometrijuma (Jabbour i sar., 1998; Jones i sar., 1998). Sa druge strane, opisani su efekti citokina koje proizvode imunokompetentne ćelije endometrijuma na sekreciju endometrijalnog PRL. U kulturi decidualnih ćelija, pokazana je dozno-zavisna inhibicija sinteze i sekrecije PRL kao posledica tretmana ovih ćelija citokinima, kao što su TNF α , IL-1 α , IL-1 β , TGF- β i IL-8 IL-2, IFN- γ (Jikihara i Handwerger, 1994; Vićovac i sar., 1994; Kanda i sar., 1999; Christian i sar., 2001). I pored značajnih razlika u fiziologiji PRL familije glodara i čoveka, Bao i sar. (2003) su pokazali da odsustvo endometrijalnog PRL i PRLR kod glodara dovodi do fetalne smrti i prevremenih pobačaja.

Iako postoji veliko interesovanje za ulogu ovog hormona/citokina u ranoj trudnoći, njegov uticaj na trofoblast još je nedovoljno poznat. Ovim radom smo želeli da ispitamo moguću ulogu PRL u procesima značajnim za uspostavljanje trudnoće ispitivanjem njegovog uticaja na ćelijsku adheziju, migraciju i invaziju trofoblasta, kao i uticaj na vijabilnost, proliferaciju i apoptozu trofoblastnih ćelija.

U ispitivanjima smo koristili citotrofoblastne ćelije izolovane iz placenti prvog trimestra normalne trudnoće i HTR-8/SVneo ćelijsku liniju. Izolovani citotrofoblast u kulturi ne proliferiše, diferencira *in vitro* i pokazuje odlike invazivnog ekstravilusnog trofoblasta. HTR-8/SVneo ćelijska linija predstavlja model invazivnog ekstravilusnog trofoblasta i koristi se za ispitivanje regulatornih mehanizama trofoblasta (Gleeson i sar., 2001; Chakraborty i sar., 2003; Huber i sar., 2006). Pokazano je da su ćelijska proliferacija, migracija i invazija HTR-8/SVneo ćelijske linije u velikoj meri regulisane istim signalnim molekulima kao i EVT ćelije (Graham i sar., 1993; Lala i sar., 2002). Zbog toga ova ćelijska linija predstavlja dobar model za proučavanje mehanizama uključenih u kontrolu proliferacije, migracije i invazije EVT ćelija pod uticajem različitih modulatora (Hannan i sar., 2010).

U ispitivanjima obuhvaćenim ovim radom primenom imunohistohemijske metode utvrdili smo da je PRLR ispoljen u sinciciotrofoblastu, ćelijskim stubovima sidrećih resica, a u manjoj meri u intersticijelnom EVT i perivaskularnim trofoblastnim ćelijama. U citotrofoblastima ćelijskih stubova, kao i u invazivnom ekstravilusnom citotrofoblastu, PRLR je bio prisutan u citoplazmi i na ćelijskoj membrani. Slična lokalizacija PRLR je bila opisana u trofoblastu horiona u poslednjem trimestru trudnoće (Maaskant i sar., 1996). Pored toga, PRLR je prisutan i u izolovanim CT ćelijama i HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji. U ispitivanim citotrofoblastnim i HTR-8/SVneo ćelijama utvrdili smo prisustvo traka molekulskih masa od 160-180 kDa, 135-150 kDa, 90-98 kDa, 60-67 kDa, 45-55 kDa i 30-40 kDa. Dobijene izoforme PRLR molekulskih masa od 90-98 kDa, 60-67 kDa, 45-55 kDa i 30-40 kDa mogle bi da predstavljaju redom: dugu formu receptora, $\Delta S1$ formu receptora, intermedijernu formu i S1b kratku formu receptora ili PRL-vezujući protein (Maaskant i sar., 1996; Hu i sar., 2001; Trott i sar., 2003). Pored toga smo detektovali i prisustvo za sada neidentifikovanih formi od 160-180 kDa i 135-150 kDa, od kojih bi veća mogla da predstavlja dimer duge forme receptora za koji je pokazano da ima masu od oko 180 kDa, dok bi manja mogla biti neki heterodimer ili diferecijalno glikozilovani oblik receptora. Nisu uočene značajne razlike u broju molekulskih formi ili njihovoj relativnoj zastupljenosti između izolovanog citotrofoblasta i HTR-8/SVneo ćelija.

Maaskant i sar. (1996) su detektovali šest molekulskih formi PRLR i to od 95, 85, 63, manje od 63, veće od 30 i 30 kDa u decidui, amnionu i horionu. Ovi autori smatraju da su forme od 95 i 85 kDa najverovatnije zrele glikozilovane forme humanog PRLR, čije su različite molekulske mase posledica različitog stepena glikozilacije. Takođe, isti autori su pokazali da sinciciotrofoblast terminske placentе ispoljava PRLR, ali u manjoj meri nego horion i decidua, što je saglasno našim rezultatima dobijenim za posteljicu prvog trimestra trudnoće. Pored osnovne forme PRLR od 95-85 kDa, detektovane su i izoforme od 63 i 30 kDa u amnionu, horionu, decidui, kao i u amniotskoj tečnosti, što bi moglo da ukaže na njihovu funkciju i u ovim tkivima. Forma PRLR veća od 30 kDa je detektovana u decidui, ali ne i u amnionu i amniotskoj tečnosti. Maaskant i sar. (1996) razmatraju mogućnost da su različite forme receptora posledica spontane degradacije ili delovanja proteolitičkih enzima. Smatra se da različiti tkivno-specifični enzimi proteolitički deluju na glikozilovanu formu PRLR od 95-85 kDa, pri čemu nastaju forme manjih molekulskih masa. Jedna od pretpostavki je i da bi kraće forme PRLR mogle da funkcionišu kao vezujući i/ili transportni proteini, koji bi nosili PRL (ligand) preko decidualnih ćelija i njihove bazalne membrane i/ili vanćelijskog matriksa amniona i horiona u amniotsku tečnost. I u drugim reproduktivnim tkivima žene, kao što su jajovodi, detektovano je više formi PRLR, i to duga forma od oko 97 kDa, intermedijarna forma od 64-97 kDa i kratke forme od 51-64 kDa (Shao i sar., 2008), kao posledica varijacija u glikozilaciji (Kline i sar., 1999). Alternativna obrada primarnog RNK transkripta PRLR, pri kojoj nastaju različite izoforme, bi mogla da reguliše nivo ekspresije duge forme receptora (Laud i sar., 2000). Pretpostavlja se da bi ekspresija duge forme receptora mogla biti veća kada je zastupljenost izoformi manjih molekulskih masa niža. Smatra se da je ovakav mehanizam ekspresije izoformi receptora značajan za ostvarivanje adekvatne fiziološke funkcije.

Pokazano je da je duga forma receptora uključena u prenos mitogenih i diferencijacionih signala, a da S1a i S1b forme receptora deluju kao dominantno-negativne i inhibiraju prenos signala posredstvom duge forme receptora (O'Neal i Yu Lee, 1994; Llovera i sar., 2000). Pretpostavlja se da jedinstvene citoplazmatske sekvence različitih formi receptora mogu dovesti do aktivacije različitih signalnih puteva i time doprineti

raznolikosti efekata prolaktina. Za sada nije poznato da li sam prolaktin ili drugi hormoni (estrogen ili progesteron) utiče na ekspresiju varijanti PRLR, što bi moglo da ga dovede u vezu sa relativnim odnosom obrazovanja pojedinih ili svih izoformi receptora. Sa druge strane, postoji mogućnost da su kratke izoforme receptora inertne što se tiče prenosa signala, i da one služe kao svojevrsna zamka za ligand kojom se ligand internalizuje i dolazi do inhibicije PRL-indukovanih signala.

Ranija istraživanja su pokazala da broj i nivo ekspresije izoformi PRLR varira između različitih tkiva (Nagano i sar., 1995; Kline i sar., 1999). Ovim radom je pokazano da je u izolovanom CT i ekstravilusnom trofoblastu duga forma dominantna monomerna izoforma u prvom trimestru trudnoće. Međutim, prikazani profil izoformi se unekoliko razlikuje od onog opisanog za horionski trofoblast terminske placente (Maskaat et al., 1996). Postoji mogućnost da različite vrste trofoblastnih ćelija karakteriše zastupljenost različitih izoformi, i da se njihova zastupljenost menja tokom gestacije. Prema tome, uloga prolaktina u trudnoći mogla bi da zavisi od nivoa samog hormona i hetero- i/ili homodimerizacije formi njegovih receptora.

Sve veći broj rezultata ukazuje na kompleksnost regulacije posredovane prolaktinskim receptorom. Na osnovu dosadašnjih istraživanja na različitim tipovima ćelija, može se pretpostaviti da se regulacija funkcije trofoblasta odvija kroz procese homo- i heterodimerizacije receptora, i to nezavisno od hormona (Kline i sar., 1999; Qazi i sar., 2006). Pored PRL indukovane dimerizacije, na transformisanim ćelijama je pokazana i ligand-nezavisna dimerizacija duge i intermedijarne forme PRLR (Gadd i Clevenger, 2006). Heterodimerizacija različitih izoformi receptora mogla bi dovesti do stvaranja inaktivnih kompleksa, što takođe može biti fiziološki značajno, obzirom da ćelije najčešće istovremeno ispoljavaju više različitih izoformi PRLR. Rezultati relativne zastupljenosti izoformi u trofoblastnim ćelijama prikazani ovim radom ukazuju da u prenosu PRL signala najverovatnije dominantnu ulogu igra homodimer duge izoforme, kao najzastupljenije subjedinice. Tome u prilog govori i uočena forma od 180 kDa, koja bi mogla da odgovara nepotpuno redukovanom homodimeru duge forme receptora.

Ranije je pomenuto da decidua produkuje PRL (Riddick i sar., 1978; Golander i sar., 1978). Međutim, važno je napomenuti da pored decidualnog PRL, postoje i drugi mogući ligandi za PRLR različitih ćelija placentalnog ležišta - placentalni laktogen i placentalni hormon rasta, koje sintetizira sinciciotrofoblast placente i intersticijalne EVT ćelije (Kurman i sar., 1984; Sakbun i sar., 1990; Ali i sar., 1991; Scippo i sar., 1993; Lacroix i sar., 2005).

Dosadašnja saznanja ukazuju da bi pored profila i relativnog odnosa različitih izoformi prolaktinskog receptora, i koncentracija prisutnog PRL mogla da ima značajnu ulogu. Tako su Kline i sar., (2002) primetili da veće koncentracije PRL deluju antagonistički na prenos signala preko duge forme, a što nije primećeno kod $\Delta S1$ forme receptora. Ovi autori smatraju da $\Delta S1$ forma receptora fiziološki funkcioniše u uslovima visoke koncentracije PRL. U placenti je detektovan visok nivo iRNK za $\Delta S1$ formu receptora (Kline i sar., 2002), a ovim radom je pokazan protein mase oko 66 kDa koji bi mogao odgovarati ovoj formi. Takođe i Clevenger i sar. (2003) su pokazali da $\Delta S1$ forma, za razliku od duge forme receptora, ne pokazuje smanjenje aktivnost pri višim koncentracijama liganda. Pretpostavlja se da je ova forma receptora uključena u regulaciju prenosa signala preko integrina, a što nije primećeno ni kod duge, ni kod intermedijarne forme. U ovom radu pokazane dominantne forme PRLR ekstravilusnog trofoblata, daju osnovu da se pretpostavi da bi i u gravidnom uterusu signalni putevi mogli biti različiti u zavisnosti od ispoljenih izoformi PRLR, kao i od koncentracije PRL u placentalnom ležištu.

Poznato je da je PRL uključen u proliferaciju i preživljavanje različitih tipova ćelija, kao što su epitelne ćelije mlečnih žlezda, limfociti, astrociti, keratinociti i dr. Labriola i sar. (2007) su pokazali da PRL stimulatorno deluje na proliferaciju β ćelija pankreasa, a Terra i sar. (2011) da je značajan i za ćelijsko preživljavanje i inhibiciju apoptoze. PRL povećava odnos Bcl-2/Bax i inhibira ključne kaspaze uključene u unutrašnji i spoljašnji put apoptoze, kao što su kaspaza -8, -9 i -3 (Terra i sar., 2011). Ispitivanja Tan i sar., (2011) su pokazala da odnos duge i kratke S1b forme receptora na ćeliji, određuje broj ćelija u odgovoru na PRL. Smatra se da povećana ekspresija duge forme receptora može uticati na povećanje broja ćelija nakon tretmana PRL i obrnuto.

Jedan od ciljeva ovog rada je bio ispitivanje mogućeg uticaja PRL na proliferaciju i apoptozu trofoblata. Pokazano je da apoptoza igra značajnu ulogu u trudnoći (Levy i sar., 2000). Procesi apoptoze i proliferacije teku paralelno, što se odražava na rast i remodelovanje placente. Na osnovu dosadašnjih istraživanja pretpostavlja se da na ove procese utiču mnogi faktori, a poseban značaj imaju lokalni faktori (Smith i sar., 1997; Huppertz i sar., 2006). Smatra se da decidualne ćelije i lokalne imunske ćelije prisutne u uterusu i placenti imaju bitnu ulogu u uspostavljanju ravnoteže između preživljavanja i apoptoze EVT ćelija (Hammer i Dohr, 2000). Veliki broj radova ukazuje da je abnormalna apoptoza prisutna u mnogim patološkim poremećajima u trudnoći, koji dovode do spontanih pobačaja, preeklampsije, ograničenja fetalnog rasta i dr. (Smith i sar., 1997; Kokawa i sar., 1998).

Uticaj PRL na proliferaciju trofoblata ispitan je ovim radom na HTR-8/SVneo ćelijama, obzirom da izolovani citotrofoblast ne proliferiše u kulturi. Ispitivanje mogućeg uticaja PRL na proliferaciju HTR-8/SVneo ćelija je bio i od praktičnog značaja kako bi se realno sagledao stimulatorni efekat PRL na ćelijsku invaziju i isključila mogućnost da je uočeni efekat posledica uvećanog broja ćelija u tretiranim uzorcima. Kada je ispitan uticaj PRL na ćelijsku vijabilnost, kao i na broj adherentnih ćelija, utvrdili smo da obe koncentracije PRL dovode do blagog povećanja broja adherentnih ćelija, dok samo koncentracija PRL od 100 ng/ml deluje stimulatorno na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija. Detaljnija imunocitohemijska i citofluorometrijska analiza ćelijske proliferacije na osnovu detekcije Ki67 antigena kao markera proliferacije, je pokazala da PRL u ispitivanim koncentracijama ima neznatan uticaj na proliferaciju. Ekspresija M30 antigena je pokazala da PRL nema uticaj na apoptozu HTR-8/SVneo ćelija. Procenat apoptotičnih ćelija u imortalizovanoj HTR-8/SVneo liniji bio je izuzetno mali i nije promenjen pod uticajem PRL.

Značajan deo ispitivanja obuhvaćenih ovim radom je bio usmeren na ispitivanje mogućeg uticaja PRL na adheziju, migraciju i invaziju trofoblata u *in vitro* testovima, obzirom da su ovi procesi ključni za uspešnu implantaciju embriona i normalnu placentaciju *in vivo*. U testovima adhezije ćelija trofoblata su korišćeni eksperimentalni

uslovi koji donekle odslikavaju uslove *in vivo* u pogledu prisustva proteina vanćelijskog matriksa, kao značajnog faktora za ispitivane procese. Smatra se da je adhezija ćelija trofoblasta za različite komponente ECM preduslov za napredovanje kroz stromu endometrijuma i formiranje funkcionalne placentе. Pored toga, pokazano je i da EVT ćelije ćelijskih stubova sintetišu ECM bogat lamininom i onkofetalnim fibronektinom (Korhonen i Virtanen, 1997). Za PRL je pokazano da utiče na adheziju različitih ćelijskih tipova. Tretman mononuklearnih ćelija periferne krvi prolaktinom stimuliše njihovu adheziju za endotelne ćelije umbilikalne vene i ovaj efekat najverovatnije uključuje PRL-indukovanu aktivaciju integrina LFA-1 i VLA-4 na leukocitima (Montes de Oca i sar., 2005). Istraživanja drugih autora su pokazala da je za diferencijaciju epitelnih ćelija mlečnih žlezda *in vitro* potrebna adhezija za bazalnu membranu, kao i izlaganje laktogenim hormonima (Streuli i sar., 1995). U ovom radu pokazano je da obe koncentracije PRL blago, ali značajno, povećavaju adheziju HTR-8/SVneo ćelija za sve ispitivane podloge. Dobijeni rezultati ukazuju da bi tretman PRL mogao da utiče na ekspresiju i/ili aktivaciju molekula značajnih za ćelijsku adheziju.

Migracija ćelija zavisi od repertoara adhezivnih molekula na površini ćelije, komponenata koje ulaze u sastav ECM, afiniteta ćelijskih receptora za komponente ECM, kao i od modulatornog uticaja drugih molekula na ove interakcije. Prilikom migracije dolazi do naizmeničnog uspostavljanja i raskidanja veza između ćelije i supstrata.

Migracija trofoblasta u našim eksperimentalnim uslovima je ispitivana na plastičnoj podlozi metodom "wound healing" tj. obnavljanja sloja ćelija na ogoljenoj površini. Na osnovu dobijenih rezultata ustanovili smo da PRL značajno stimuliše migraciju HTR-8/SVneo ćelija. U literaturi postoje podaci o učešću PRL u migraciji normalnih i kancerskih ćelija. Pokazano je da PRL može regulisati migraciju leukocita preko vaskularnog endotela posredstvom aktivacije specifičnih integrina (Montes de Oca i sar., 2005). Za PRL je pokazano da povećava migraciju i deluje kao hemoatraktant ćelija kancera dojke (Maus i sar., 1999) i jajnika (Tan i sar., 2011). Pretpostavlja se da je duga forma receptora uključena u taj proces. Tan i sar. (2011) su pokazali da tretman PRL ne utiče na broj ćelija kancera jajnika, ali povećava ćelijsku migraciju, što je u skladu sa našim rezultatima. Tako bi jedna

od pretpostavljenih uloga decidualnog PRL mogla biti učešće u stvaranju invazivnog fenotipa migratornih ekstravilusnih trofoblastnih ćelija preko smanjenja ekspresije nekog od adhezivnih molekula, koji učestvuju u interakcijama tipa ćelija-ćelija. Pokazano je da je kod čoveka migracija trofoblastnih ćelija regulisana uzajamnim dejstvom lokalno aktivnih citokina i faktora rasta uključujući faktor stimulacije kolonija-1, epidermalni faktor rasta (EGF), IL-8 i insulinu-sličan faktor rasta-I (Bass i sar., 1994; Hamilton i sar., 1998; Aplin i sar., 2000; Jovanović i sar., 2010).

Glavni cilj ovog rada bilo je ispitivanje mogućeg uticaja decidualnog PRL na invaziju trofoblastnih ćelija, s obzirom da je invazija trofoblasta neophodna za procese implantacije i placentacije.

Smatra se da je proces invazije trofoblasta uslovljen aktivacijom određenih gena u procesu diferencijacije, ali da može biti modulisan uticajem brojnih faktora. Njih sintetišu različiti tipovi ćelija sa kojima trofoblast dolazi u kontakt, i mogu imati pozitivan ili negativan uticaj na ovaj proces. Za razliku od invazije neoplastičnih ćelija, invazija EVT ćelija je prostorno i vremenski strogo regulisana velikim brojem autokrinih i parakrinih faktora, uključujući citokine, hormone i parcijalni pritisak kiseonika (Bischof i sar., 2000; Lala i Chakraborty, 2003; Bischof i Irminger-Finger, 2005). Invazivne EVT ćelije unutar placentalnog ležišta izložene su uticaju velikog broja faktora rasta i citokina. Njih stvaraju različiti ćelijski tipovi, koji utiču jedan na drugi, što može dovesti do promene ili ukidanja individualnih efekata. Disbalans citokina može dovesti do patoloških poremećaja kao što su *placenta accreta*, preeklampsija i druge bolesti vezane za neadekvatnu trofoblastnu invaziju (Goldman-Wohl i sar., 2000).

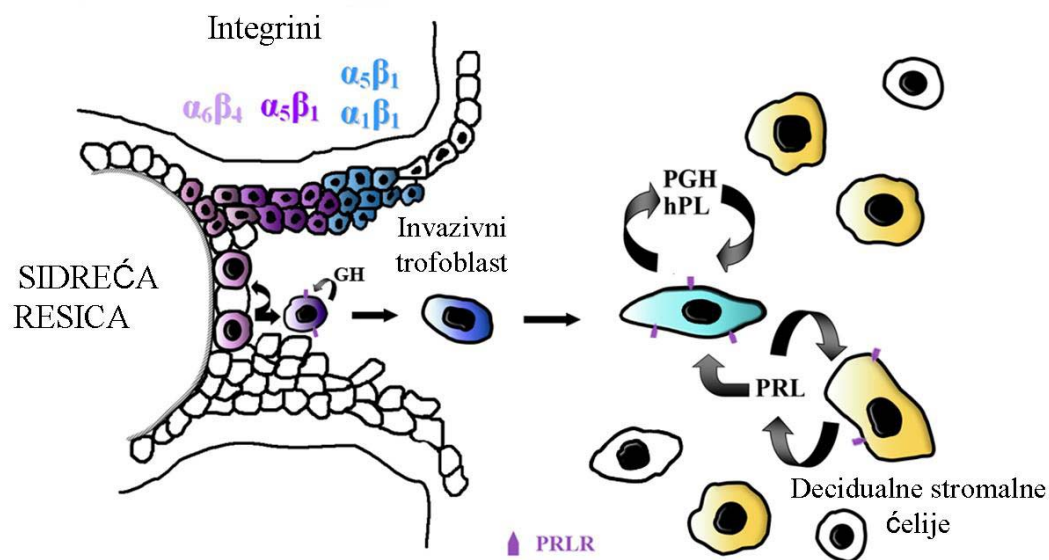
Nekoliko mehanizama je predloženo za ograničavanje invazije EVT ćelija i to su smanjena migracija, promenjena ekspresija adhezivnih molekula ili MMP, formiranje terminalno diferenciranih trofoblastnih ćelija i apoptoza (Huppertz i sar., 1998; Lacey i sar., 2002; Kemp i sar., 2002). Radovi različitih autora pokazuju da je za vreme prvog trimestra normalne trudnoće apoptoza značajan mehanizam za ograničavanje invazije EVT ćelija, dok se u drugom trimestru apoptoza značajno smanjuje i drugi mehanizmi regulišu

trofoblastnu invaziju. Da li će citotrofoblastne ćelije ući u invaziju, formirati sincicijum ili ući u apoptozu zavisi od autokrinih faktora samih ćelija trofoblasta, kao i od parakrinih faktora decidue (Bischof i sar., 2000). Pokazano je da CD56⁺ NK ćelije u uterusu indukuju apoptozu EVT ćelija putem direktne interakcije ćelija ili delovanjem citokina, kao što je IFN γ koji aktivira citotoksične T ćelije i povećava aktivnost kaspaza (Ahn i sar., 2002).

U ovom radu smo pokazali da različite koncentracije PRL značajno stimulišu invaziju izolovanih CT i HTR-8/SVneo ćelija. Stimulacija invazije u našim eksperimentima dobijena je već pri koncentraciji PRL od 100 ng/ml, što je u opsegu efektivne koncentracije GH i količine PRL koju sekretuje tkivo decidue *in vitro* (Riddick i sar., 1979; Vićovac i Genbačev, 1988). Dobijena stimulacija ćelijske invazije prolaktinom saglasna je ranijem nalazu Lacroix i sar. (2005). Oni su ispitivali uticaj GH, pripadnika familije proteina u koju spada i PRL, na EVT ćelije. Njihovi rezultati pokazuju da GH stimuliše invaziju trofoblastnih ćelija, koja je još izraženija pod uticajem PGH. To bi moglo biti posledica vezivanja i dalje aktivacije receptora za GHR i u manjoj meri PRLR. Sa druge strane, ispitujući uticaj PRL ovi autori nisu uočili promene u trofoblastnoj invaziji (Lacroix i sar., 2005). Ovaj podatak je u direktnoj suprotnosti sa rezultatima prikazanim ovim radom, ali u ovom trenutku nismo u mogućnosti da objasnimo ovo neslaganje, obzirom da nisu navedeni ni izvor ni karakteristike preparata PRL korišćenog u studiji Lacroix i sar. (2005). Nasuprot tome, preparat PRL korišćen u ovom radu, kako je navedeno u poglavlju Materijal i metode, potiče iz renomirane inostrane institucije i ima deklarisanu biološku aktivnost, koju potvrđuju i ovde prikazani rezultati.

Bez obzira na pomenuto neslaganje, kada kao celinu posmatramo rezultate delovanja GH i PGH s jedne strane (Lacroix i sar., 2005) i ovde prikazane rezultate uticaja PRL, uočava se koherentna slika koja potvrđuje značaj ovih citokina za funkciju trofoblasta. Naime, imunohistohemijska lokalizacija GH i GHR u nekoliko proksimalnih slojeva ćelijskog stuba (Lacroix i sar., 2005), i ovde pokazani PRLR, sugeriše da bi ovaj hormon mogao da deluje kao autokrini stimulator. Mogli bismo da pretpostavimo da se sa infiltracijom EVT ćelija distalnog dela ćelijskih stubova u deciduu bogatu prolaktinom, povećava značaj parakrinih signala, dok se istovremeno količina GH koji produkuje EVT

smanjuje (Lacroix i sar., 2005), što je shematski prikazano na slici 30. U prilog značaja PRL za trofoblast *in vivo* govore u literaturi dostupni podaci da se smanjena ekspresija endometrijalnog PRL može dovesti u vezu sa idiopatskom neplodnošću i ponavljanim pobačajima (Garzia i sar., 2004).



Slika 30. Shematski prikaz mogućih autokrinih/parakrinih signala preko PRLR u diferencijaciji EVT sidreće resice

Smatra se da je u okolini invazivnog trofoblasta vanćelijski matriks uglavnom sastavljen od kolagena tipa IV, laminina, heparin sulfata i dr., dok su u dubljim slojevima decidue zastupljeniji kolagen tipa IV i fibronektin (Damsky i sar., 1993; Damsky i sar., 1994). Takođe i EVT ćelije proizvode različite komponente ECM i menjaju svoj integrinski repertoar paralelno sa promenama u komponentama ECM za vreme procesa invazije. EVT ćelije *in situ* se menjaju od proliferativnih u proksimalnom delu ćelijskog stuba do invazivnih i neproliferativnih u distalnom delu stuba (Genbačev i sar., 2000). Paralelno sa tim dolazi do smanjenja ekspresije integrina $\alpha_6\beta_4$, posredstvom koga se ostvaruje interakcija sa bazalnom membranom, dok su u invazivnim CT ćelijama prisutni integrini $\alpha_5\beta_1$ i $\alpha_1\beta_1$ (Damsky i sar., 1993; Damsky i sar., 1994; Lim i sar., 1997). U preeklampsiji CT ćelije povećano ekspimiraju subjedinice integrina $\alpha_5\beta_1$, ali ne dolazi ni do povećanja ekspresije $\alpha_1\beta_1$, ni smanjenja ekspresije $\alpha_6\beta_4$ integrina (Damsky i sar., 1994;

Redline i Patterson, 1995). Zhou i sar. (1993) su zapazili da je integrin $\alpha_5\beta_1$, ali ne i $\alpha_1\beta_1$ povećano eksprimiran u invazivnim CT u preeklampsiji, što ukazuje da adhezivni fenotip ovih ćelija nije optimalan za invaziju. Damsky i sar. (1994) smatraju da bi α_1 i α_5 subjedinice integrina mogle biti uključene u regulaciju invazivnosti *in vitro*. Budući da smo pokazali da PRL utiče na migraciju i invaziju trofoblasta, u narednim eksperimentima hteli smo da ispitamo ekspresiju subjedinica integrina α_5 i α_1 , kao poznatih efektorskih molekula u ovim procesima. Western blot analiza ćelijskih lizata je pokazala da tretman PRL dovodi do povećanja ekspresije α_5 i α_1 subjedinica integrina u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji. Stimulacija α_1 subjedinice integrina je izraženija, što se može dovesti u vezu sa povećanom invazivnošću ćelija tretiranih PRL. Pored povećanja ekspresije integrina efekat PRL je mogao da bude indukovano i dodatnim mehanizmima, kao što su aktivacija integrina i/ili drugih receptora. U različitim *in vitro* sistemima PRL-indukovana stimulacija ćelijske adhezije preko integrina je bila povezana sa povećanjem ekspresije hemokinskog receptora spregnutim sa proteinom G (Montes de Oca i sar., 2005). Patel i sar. (2001) su pokazali da mononuklearne ćelije periferne krvi (engl. Peripheral Blood Mononuclear Cell - PBMC) ispoljavaju različite hemokinske receptore, a da je tretman PRL indukovao ekspresiju hemokinskog receptora CXCR3 u T limfocitima, i pospešio adheziju PBMC za endotelne ćelije. PRL stimuliše ćelijsku adheziju leukocita aktivacijom integrina LFA-1 i VLA-4 (Montes de Oca i sar., 2005). Pored toga, smatra se da i drugi citokini i faktori rasta koji utiču na trofoblastnu invaziju takođe mogu uticati na ekspresiju integrina. Epidermalni faktor rasta, IL-6, IL-8 takođe utiču na ekspresiju integrina (Leach i sar., 2004; Jovanović i Vićovac, 2009; Jovanović i sar., 2010). EGF u kulturi citotrofoblastnih ćelija dovodi do promene integrinskog repertoara, i zamene integrina α_6 integrinom α_5 , što je deo puta diferencijacije u ekstravilusni trofoblast *in vivo*. IL-6 je stimulisao ekspresiju α_1 , α_5 i β_1 , dok je IL-8 stimulisao ekspresiju α_5 i β_1 , ali ne i ekspresiju α_1 subjedinica integrina (Jovanović i Vićovac, 2009; Jovanović i sar., 2010). Ispitivanja Lacroix i sar. (2005) su pokazala da PGH dovodi do povećanja ekspresije α_5 subjedinice integrina u EVT ćelijama, što je saglasno ovde pokazanim rezultatima za PRL, a što je posebno značajno s obzirom da oba hormona/citokina pripadaju istoj familiji i deluju preko PRLR na stimulaciju invazije CT. U opisanim eksperimentalnim uslovima naše studije ćelijska invazija je ispitivana na

Matrigelu, mešavini komponenata vanćelijskog matriksa, koji pomaže da se očuva integrinski repertoar sličan repertoaru ovih ćelija u uterusu, a efekti modulirajućih faktora mogu imati implikacije za iste procese *in vivo*. Kao što je pokazano u literaturi, promena u ekspresiji integrina od α_6 do α_1 je značajna za normalnu invaziju. Povećanje ekspresije integrina α_1 pod uticajem PRL je u pozitivnoj korelaciji sa ćelijskom invazijom *in vitro*. Budući da integrini mogu prenositi signale preko ćelijske membrane i to u oba smera, smatra se da oni mogu imati značajnu ulogu u prenosu signala u zoni interakcije majke i fetusa (Yamada i Geiger, 1997; Giancotti i Ruoslahti, 1999). Sa druge strane, nedostatak ekspresije α_1 subjedinice integrina dovodi do smanjenja invazije trofoblasta *in vitro* i patološkog poremećaja sa smanjenom trofoblastnom invazijom, preeklampsije *in vivo* (Zhou i sar., 1993; Genbačev i sar., 1996). Antitela na laminin, kolagen tip IV ili integrin α_1 inhibiraju invaziju *in vitro* ukazujući na ulogu $\alpha_1\beta_1$ -laminin ili $\alpha_1\beta_1$ -kolagen tip IV interakcije (Harris i sar., 2009). Librach i sar. (1991) su pokazali da antitela na α_5 subjedinicu integrina stimulišu invaziju CT, a antitela na α_1 je inhibiraju. Tako, interakcija CT ćelija sa fibronektinom ograničava invaziju ovih ćelija, dok interakcija sa lamininom preko integrina $\alpha_1\beta_1$ olakšava ovaj proces. Interakcije citotrofoblast-fibronektin i citotrofoblast-laminin imaju suprotan efekat na invaziju ovih ćelija, ukazujući da ukupna invazivna sposobnost CT ćelija zavisi od relativnog doprinosa različitih adhezivnih interakcija (Damsky i sar., 1994). Povećana ekspresija $\alpha_1\beta_1$ integrina je značajna za sticanje invazivnog fenotipa CT ćelija za vreme rane gestacije. Ekspresija integrina $\alpha_1\beta_1$ se smanjuje kako trudnoća odmiče, tako da CT izolovan iz placenti na kraju trudnoće ne ispoljava ove subjedinice integrina. To ukazuje da integrini doprinose i vremenskoj regulaciji invazivnosti CT (Damsky i sar., 1994). U kulturama eksplanata normalne trudnoće otkriveno je da se ekspresija β_1 i $\alpha_5\beta_1$, kao i fibronektina i kolagena tipa IV smanjuje u EVT ćelijama kako one prodiru u dublje slojeve permisivne podloge, u poređenju sa integrinskim repertoarom EVT ćelija u distalnim delovima ćelijskih stubova (Vićovac i sar., 1995; Aplin i sar., 2000).

Galektini mogu da učestvuju u različitim biološkim procesima, uključujući ćelijsku migraciju, invaziju i apoptozu (Hsu i Liu, 2004). Gal-1 je bio prvi galektin detektovan u

reproduktivnom traktu žene i prvo je izolovan iz humane placente (Hirabayashi i Kasai, 1984). Ovaj galektin se dovodi u vezu sa nekim patološkim stanjima u trudnoći, kao što su preeklampsija, rani gubitak trudnoće, maligne bolesti trofoblasta (Božić i sar., 2004; Liu i sar., 2006; Jeschke i sar., 2007). Posebnu pažnju pobuđuje rezultat studije u kojoj je proteomskom analizom utvrđeno da je gal-1 jedan od proteina za koje je pokazana korelacija sa nepovoljnim ishodom trudnoće (Liu i sar., 2006). Pored toga, nedavno publikovani rezultati naše grupe su pokazali u *in vitro* modelu da gal-1 doprinosi trofoblastnoj invazivnosti (Kolundžić i sar., 2011). Kada je endogeni gal-1 blokiran anti-gal-1 antitelima ćelijska invazija se značajno smanjuje, dok dodavanje rekombinantnog gal-1 stimuliše ćelijsku invaziju.

Obzirom da je PRL stimulisao migraciju i invaziju ćelija ispitivana je i mogućnost da je gal-1 uključen u ovaj proces. Rezultati prikazani u ovom radu ukazuju da je nivo gal-1 proteina umereno povećan pod uticajem prolaktina, što ukazuje da bi gal-1 u određenoj meri mogao da doprinese stimulaciji invazije trofoblasta indukovane prolaktinom. Nedavno je pokazano da PRL učestvuje u regulaciji ekspresije gal-1 u žutom telu miša (Nio-Kobayashi i Iwanaga, 2012). U drugim sistemima je pokazano da galektini mogu da promovišu ili inhibiraju ćelijsku migraciju.

Ćelijski mehanizmi uključeni u ove procese ispitivani su na različitim modelima. Na glatko-mišićnim ćelijama je pokazano da interakcija gal-1 sa $\alpha_1\beta_1$ integrinom dovodi do ćelijske migracije posredovane vezivanjem za laminin (Moiseeva i sar., 2003). Fischer i sar. (2005) su pokazali na ćelijama epitelnih karcinoma da gal-1-indukovana inhibicija rasta zahteva funkcionalnu interakciju sa $\alpha_5\beta_1$ integrinom. Gal-1 povećava adheziju različitih tipova ćelija za ECM preko umrežavanja integrina ispoljenih na ćelijskoj površini sa komponentama ECM, kao što su laminin i fibronektin (Moiseeva i sar., 1999; van den Brule i sar., 2003). Moiseeva i sar. (1999) na osnovu ispitivanja na vaskularnim glatko-mišićnim ćelijama smatraju da bi gal-1 mogao da služi kao modulator interakcija ovih ćelija sa komponentama ECM, kao što su laminin i fibronektin. Fiziološki, migracija preko supstrata sastavljenim od više komponenata zavisi od njihove relativne zastupljenosti, gustine receptora za svaki supstrat, afiniteta receptora za supstrat itd. Uticaj ECM na

ćelijsku adheziju i migraciju, može biti značajno promenjen kada su komponente ECM prisutne u smeši u odnosu na delovanje pojedinačnih komponenti. Obzirom da se gal-1 vezuje za laminin, fibronektin, integrine ($\alpha_1\beta_1$), površinske proteoglikane, njegova interakcija je u velikoj meri specifična za tip ćelije. Prilikom decidualizacije dolazi do promene sastava i reorganizacije ECM, tako da se smatra da trofoblastni gal-1 može interagovati kako sa ECM, kojeg proizvode same EVT ćelije, tako i sa decidualnim ECM i na taj način olakšati invaziju decidualnog tkiva (Church i sar., 1997).

Na osnovu navedenog moglo bi se zaključiti da povećana invazija trofoblasta pod uticajem PRL, može biti posledica povećane ekspresije integrina α_5 , α_1 i gal-1, koji daljom direktnom interakcijom, i/ ili interakcijom sa glikoproteinima ECM dodatno amplifikuju efekat.

Značajan aspekt ćelijske invazije je i degradacija ECM proteazama koje luče invazivne ćelije (Cohen i sar., 2005). U ranoj trudnoći veliki broj proteaza i njihovih inhibitora je prisutan u tkivu placentnog ležišta, kako u decidualnim stromalnim ćelijama, tako i u EVT (Anacker i sar., 2011). Prisustvo MMP-2 je pokazano imunohistohemijski u proksimalnom i distalnom delu ćelijskih stubova, dok je MMP-9 ispoljena u invazivnim ćelijama (Huppertz i sar., 1998). Isaka i sar. (2003) smatraju da su CT ćelije u distalnim delovima ćelijskih stubova invazivnije u poređenju sa intersticijalnim ćelijama. MMP-2 i MMP-9 su enzimi značajni za degradaciju bazalne membrane, koja se sastoji uglavnom od kolagena tipa IV (Nagase i Woessner, 1991). MMP-2 je imunolokalizovana u invazivnom trofoblastu, okolnom ECM, kao i decidualnim ćelijama (Huppertz i sar., 1998; Huisman i sar., 2004; Jones i sar., 2006). Neki autori smatraju da MMP-9 ima značajniju ulogu u trofoblastnoj invaziji, a da profil ovih enzima zavisi od stadijuma gestacije (Librach i sar., 1991; Xu i sar., 2000). Jedna od pretpostavki je da MMP-2 predstavlja glavnu želatinazu u ranom trofoblastu (6. do 8. nedelja), a da je MMP-9 dominantna od 9. do 12. nedelje gestacije (Xu i sar., 2000; Staun-Ram i sar., 2004). Takođe, Anacker i sar. (2011) su detektovali visok nivo aktivne MMP-2 i MMP-9 u kulturi ranih trofoblastnih ćelija, što je u saglasnosti sa ranijim *in vitro* studijama (Xu i sar., 2000; Isaka i sar., 2003). Pored sinteze i sekrecije matriksnih metaloproteinaza, EVT ćelije sekretuju i inhibitore ovih proteaza, što

znači da je aktivnost trofoblastnih MMP regulisana na autokrini i parakrini način aktivnošću samih invazivnih trofoblastnih i decidualnih ćelija (Hurskainen i sar., 1996; Ruck i sar., 1996; Huppertz i sar., 1998). Decidua je značajan izvor inhibitora metaloproteinaza. Od ranije je poznato da smanjenje aktivnosti decidualnih inhibitora ovih proteaza vodi do obimne trofoblastne invazije, što je uočeno u patološkom poremećaju invazije, *placenta accreta* (Librach i sar., 1991).

Naši rezultati pokazuju da je PRL pri koncentraciji od 1000 ng/ml blago povećao aktivnost obe metaloproteinaze, ali to povećanje nije bilo statistički značajno. Postoji mogućnost da bi duže vreme izlaganja PRL moglo značajnije uticati na aktivnost ispitivanih MMP. Bryant-Greenwood i Yamamoto (1995) su pokazali da je PRL jedan od lokalnih hormona na mestu kontakta majke i fetusa, koji je sposoban da poveća transkripciju i translaciju specifičnih metaloproteinaza u kasnoj trudnoći. Takođe, postoji i mogućnost da bi PRL stimulišući ekspresiju subjedinica integrina α_1 , α_5 , mogao pozitivno da utiče na invaziju EVT ćelija pomoću auto-regulacije ekspresije i sekrecije određenih tipova MMP, a kroz interakciju integrina i liganada ECM.

Pored uloge PRL u normalnoj trudnoći, što je bio predmet ovog istraživanja, postoje i pretpostavke da je PRL uključen u etiologiju preeklampsije. Pokazano je da je ekspresija MMP-2, MMP-9 i TIMP-1 povećana u preeklampsiji (Montagnana i sar., 2009; Poon i sar., 2009), a njihov uticaj može biti ostvaren direktno ili indirektno, preko forme od 16 kDa (Reuwer i sar., 2010). Naime, povećanje aktivnosti MMP može dovesti do disbalansa u formama PRL od 23 i 16 kDa, čime bi mogla da se objasni neadekvatna rana placentacija i kasnija endotelna disfunkcija koja je u centru patofiziologije preeklampsije. Tome u prilog idu podaci da žene sa preeklampsijom imaju povećan nivo fragmenta PRL od 16 kDa u serumu, urinu i amniotskoj tečnosti (Gonzalez i sar., 2007).

Rezultati dobijeni u okviru ovoga rada pružaju nova saznanja koja ukazuju da PRL utiče na funkciju trofoblastnih ćelija *in vitro*, što bi moglo da ukaže i na fiziološku ulogu decidualnog prolaktina *in vivo*. Ovim ispitivanjima otvara se mogućnost za dalje ispitivanje biološke uloge prolaktina, kao i drugih članova ove familije proteina u ranoj trudnoći.

ZAKLJUČCI

- U tkivu placentnog ležišta receptor za prolaktin je ispoljen na sinciotrofoblastu, citotrofoblastu ćelijskih stubova sidrećih resica, i u manjoj meri na invazivnim ekstravilusnim citotrofoblastnim ćelijama, kao i u perivaskularnom trofoblastu. Trofoblastne ćelije ispoljavaju receptor za prolaktin i to 31% citotrofoblastnih ćelija po izolovanju tripsinom iz tkiva posteljice i 100% posle 24h u primarnoj kulturi, kao i 86% HTR-8/SVneo ćelija.
- Detektovano je prisustvo više različitih izoformi prolaktinskog receptora, i to od 90-98 kDa, 60-67 kDa, 45-55 kDa, 30-40 kDa, kao i, za sada neidentifikovane, forme većih molekulskih masa 160-180 kDa i 135-150 kDa.
- Obe ispitivane koncentracije PRL (100 ng/ml i 1000 ng/ml) povećavaju broj adherentnih ćelija, stimulišu adheziju i migraciju HTR-8/SVneo ćelija.
- PRL u ispitivanim koncentracijama nema značajan uticaj na apoptozu HTR-8/SVneo ćelija.
- PRL značajno stimuliše invaziju HTR-8/SVneo ćelija, kao i ćelija izolovanog citotrofoblasta. Mehanizam delovanja prolaktina na *in vitro* migraciju i invaziju HTR-8/SVneo ćelija uključuje stimulaciju ekspresije subjedinica integrina α_1 , α_5 , kao i gal-1.
- Na osnovu prikazanih rezultata po prvi put je pokazano da prolaktin ima uticaja na funkciju trofoblasta *in vitro*, što bi moglo imati slične implikacije za proces trofoblastne invazije *in vivo*.

LITERATURA

Ahn EY, Pan G, Vickers SM, McDonald JM. IFN-gamma upregulates apoptosis-related molecules and enhances Fas-mediated apoptosis in human cholangiocarcinoma. *Int J Cancer* 2002; 100: 445-451.

Ali S, Pellegrini I, Edery M, Lesueur L, Paly J, Djiane J, Kelly PA. A prolactin-dependent immune cell line (Nb2) expresses a mutant form of prolactin receptor. *J Biol Chem* 1991; 266: 20110-20117.

Amit T, Dibner C, Barkey RJ. Characterization of prolactin- and growth hormone-binding proteins in milk and their diversity among species. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 130: 167-180.

Anacker J, Segerer SE, Hagemann C, Feix S, Kapp M, Bausch R, Kämmerer. Human decidua and invasive trophoblasts are rich sources of nearly all human matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod* 2011; 17: 637-652.

Aplin JD. Expression of integrin alpha 6 beta 4 in human trophoblast and its loss from extravillous cells. *Placenta* 1993; 14: 203-215.

Aplin JD, Haigh T, Vicovac L, Church HJ, Jones CJP. Anchorage in the developing placenta: an overlooked determinant of pregnancy outcome? *Human Fertility* 1998; 1: 75-79.

Aplin JD. The cell biological basis of human implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 757-764.

Aplin JD, Kimber SJ. Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 48-59.

Arden KC, Boutin J-M, Djiane J, Kelly PA, Cavenee WK. The receptors for prolactin and growth hormone are localized in the same region of human chromosome 5. *Cytogenet Cell Genet* 1990; 53: 161-165.

Autio-Harmanien H, Hurskainen T, Niskasaari K, Hoyhtya M, Tryggvason K. Simultaneous of 70 kilodalton type IV collagenase and type IV collagen alpha 1 (IV) chain genes by cells of early human placenta and gestational endometrium. *Lab Invest* 1992; 67: 191-200.

Bao L, Bowen-Shauver JM, Stocco C, Horseman ND, Gibori G. The role of decidual prolactin in pregnancy: studies using prolactin knockout mice. *Proceedings of Endocrine Society Meeting, Philadelphia* 2003; 78.

Bass KE, Morrish D, Roth I, Bhardwaj D, Taylor R, Zhou Y, Fisher SJ. Human cytotrophoblast invasion is up-regulated by epidermal growth factor: evidence that paracrine factors modify this process. *Develop Biol* 1994; 164: 550-561.

Baumgartner JW, Wells CA, Chen CM, Waters MJ. The role of the WSxWS motif in growth hormone receptor function. *J Biol Chem* 1994; 269: 29094-29101.

Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta. Springer-Verlag, NY 2000.

Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Reviews* 1996; 17: 639-669.

Bentzien F, Struman I, Martini F-J, Martial J, Weiner R. Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1^{-/-} mice. *Cancer Res* 2001; 61: 7356-7362.

Berlanga JJ, Gualillo O, Buteau H, Applanat M, Kellz PA, Edery M. Prolactin activates tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *J Biol Chem* 1997; 272: 2050-2052.

Bernichtein S, Kinet S, Jeay S, Madern M, Martial JA, Kelly PA, Goffin V. S179D-hPRL, a pseudo-phosphorylated human prolactin analog, is an agonist and not an antagonist. *Endocrinology* 2001; 142: 3950-3963.

Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 1997; 18: 26-45.

Bischof P, Friedl E, Martelli M, Campana A. Expression of extracellular matrix-degrading metalloproteinases by cultured human cytotrophoblast cells: effects of cell adhesion and immunopurification. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 1791-1801.

Bischof P, Martelli M. Current topic: proteolysis in the penetration phase of the implantation process. *Placenta* 1992; 13: 17-24.

Bischof P, Meister A, Campana A. Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion-a review. *Placenta* 2000; 21: S55-S60.

Bischof P, Irminger-Finger I. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Int Biochem Cell Biol* 2005; 37: 1-16.

Bokoch GM. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* 1995; 86: 1649-1660.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly P. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 1998; 19: 225-268.

Bowen JM, Landis Keyes P, Warren JS, Townson DH. Prolactin-induced regression of the rat corpus luteum: expression of monocyte chemoattractant protein-1 and invasion of macrophages. *Biol Reprod* 1996; 54: 1120-1127.

Bowen JA, Hunt JS. The role of integrins in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 223: 331-343.

Boyd JD, Hamilton WJ. The Human Placenta. Heffer and Sons, Cambridge, MA, 1970, pp 1-365.

Božić M, Petronijević M, Milenković S, Atanacković J, Lazić J, Vićovac L. Galectin-1 and galectin-3 in the trophoblast of the gestational trophoblastic disease. *Placenta* 2004; 25: 797-802.

Brosens JJ, Hayashi N, White JO. Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 1999; 140: 4809-4820.

Brosens JJ, Gellersen B. Death or survival – progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. *J Mol Endocrinol* 2006; 36: 389-398.

Brown RJ, Adams JJ, Pelekanos Y, Wan WJ, McKinstry K, Palethorpe RM, Seeber TA, Monks KA, Eidne MW, Parker MJ. Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12: 814-821.

Bryant-Greenwood GD, Yamamoto S. Control of peripartal collagenolysis in the human chorio-decidua. *Am Obstet Gynecol* 1995; 172: 63-70.

Bulmer JN. Immune cells in decidua. In: Kurpysz M, Fernandez N, eds. *Immunology of human reproduction*. Oxford: BIO Scientific, 1995; 313-334.

Burghardt RC, Johnson GA, Jarger LA, Ka H, Garlow JE, Spencer TE, Bazer FW. Integrins and Extracellular Matrix Proteins at the Maternal-Fetal Interface in Domestic Animals. *Cell Tissues Organs* 2002; 172: 202-217.

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: 718-724.

Caravella JA, Lyne PD, Richards WG. A partial model of the erythropoietin receptor complex. *Proteins* 1996; 24: 394-401.

Chakraborty C, Barbin YP, Chakrabarti S, Chidiac P, Dixon SJ, Lala PK. Endothelin-1 promotes migration and induces elevation of (Ca²⁺) and phosphorylation of MAP kinase of a human extravillous trophoblast cell line. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 201: 63-73.

Christian M, Marangos P, Mak I, McVey J, Barker F, White J, Brosens JJ. Interferon-gamma modulates prolactin and tissue expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 2001; 142: 3142-3151.

Church HJ, Richards AJ, Aplin JD. Laminin in decidua, placenta and choriocarcinoma cells. *Trophoblast Res* 1997; 10: 143-162.

Clapp C, Aranda J, González C, Jeziorski MC, Martinez de la Escalera G. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17: 301-307.

Clevenger CV, Ngo W, Sokol DL, Luger SM, Gewirtz AM. Vav is necessary for prolactin-stimulated proliferation and is translocated into the nucleus of a T-cell line. *J Bio Chem* 1995; 269: 5559-5565.

Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE, Schuler LA. The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocr Rev* 2003; 24: 1-27.

Cohen M, Meisser A, Bischof P. Metalloproteinases and human placental invasiveness. *Placenta* 2005; 27: 783-793.

Cooke NE, Coit D, Shine J, Baxter JD, Martial JA. Human prolactin: cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J Biol Chem* 1981; 256: 4007-4016.

Critchley H, Healy D. Effects of oestrogen and progesterone on the endometrium. In *Estrogens and Progesterons in Clinical Practice*. Eds R Jansens, R Lobo, M Whitehead. Churchill Livingstone, London, 1998, 145-161.

Curnow SJ, Barad M, Brun-Roubereau N, Schmitt-Verhulst AM. Flowcytometric analysis of apoptotic and nonapoptotic T-cell receptor-transgenic thymocytes following *in vitro* presentation of antigen. *Cytometry* 1994; 16: 41-48.

Damsky CH, Sutherland A, Fisher SJ. Extracellular matrix 5: Adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation and placentation. *FASEB J* 1993; 7: 1320-1329.

Damsky C, Librach C, Lim K, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 1994; 120: 3657-3666.

Das R, Vonderhaar BK. Transduction of prolactin's (PRL) growth signal through both long and short forms of the PRL receptor. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 1750-1759.

Denker HW. Trophoblast-endometrial interactions at embryo implantation: a cell biological paradox. *Trophoblast Res* 1990; 4: 1-27.

Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocrine Reviews* 2004; 25: 341-373.

DiMattia GE, Gellersen B, Duckworth ML, Friesen HG. Human prolactin gene expression. The use of an alternative noncoding exon in decidua and the IM-9-P3 lymphoblast cell line. *J Biol Chem* 1990; 265: 16412-16421.

Dubernard G, Galtier-Fougairolles M, Cortez A, Uzan S, Challier JC. Immunohistochemistry of adhesion molecules, metalloproteinases and NO-synthases in extravillous trophoblast of tubal pregnancy. *Cell Mol Biol* 2005; 51 (Suppl.): OL829-837.

Eriksson L, Frankenne F, Eden S, Hennen G, Von Schoultz B. Growth hormone 24-H serum profiles during pregnancy lack of pulsatility for the secretion of the placental variant. *BR J Obstet Gynecol* 1989; 96: 949-953.

Eyal O, Jomain J-B, Kessler C, Goffin V, Handwerger S. Autocrine prolactin inhibits human uterine decidualization: A novel role for prolactin. *Biol Reprod* 2007; 76: 777-783.

Finn CA. The adaptive significance of menstruation. *Hum Reprod* 1994; 9: 1202-1207.

Fischer C, Sanchez-Ruderisch H, Welzel M, Wiedenmann B, Sakai T, Andre S, Gabius HJ, Khachigian L, Detjen KM, Rosewicz S. Galectin-1 interacts with the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. *J Biol Chem* 2005; 280: 37266-37277.

Frankenne F, Rentier-Delrue F, Scippo ML, Martial J, Hennen G. The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66: 1171-1180.

Frankenne F, Scippo ML, Van Beeumen J, Igout A, Hennen G. Identification of placental human growth hormone as the growth hormone-V gene expression product. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 15-18.

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000; 80: 1523-1631.

Gadd SL, Clevenger CV. Ligand-independent dimerization of the human prolactin receptor isoforms: functional implications. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 2734-2746.

Garzia E, Borgato S, Cozzi V, Doi P, Bulfamante G, Persani L, Cetin I. Lack of expression of endometrial prolactin in early implantation failure: a pilot study. *Hum Reprod* 2004; 19: 1911-1916.

Gellersen B, DiMattia GE, Friesen HG, Bohnet HG. Prolactin (PRL) mRNA from human decidua differs from pituitary PRL mRNA but resembles the IM-9-P3 lymphoblast PRL transcript. *Mol Cellular Endocrinol* 1989; 64: 127-130.

Gellerson B, Kempf R, Telgmann R, DiMattia GE. Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 356-373.

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: 540-550.

Genbacev O, McMaster MT, Fisher SJ. A repertoire of cell cycle regulators whose expression is coordinated with human cytotrophoblast differentiation. *Am J Pathol* 2000; 157: 1337-1351.

Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285: 1028-1032.

Giudice L. Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Hum Reprod* 1999; 14: 3-16.

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: 2484-2493.

Goffin V, -Struman I, Mainfroid V, Kinet S, Martial JA. Evidence for a second receptor binding site on human prolactin. *J Biol Chem* 1994; 269: 32598-32606.

Goffin V, Kelly PA. Prolactin/growth hormone receptor family: structure/function relationships. *J Mammary Gland Biol Neopl* 1996; 2: 7-17.

Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA, Martial JA. Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen and related proteins in mammals. *Endocrine Reviews* 1996; 17: 385-410.

Goffin V, Ferrag F, Kelly PA. Molecular aspects of prolactin and growth hormone receptors. In : LeRoith D (ed) *Advances in Mol Cell Endocrinol* 1998; 2: 1-33.

Golander A, Hurley T, Barrett J, Hizi A, Handwerger S. Prolactin synthesis by human chorion-decidual tissue: a possible source of prolactin in the amniotic fluid. *Science* 1978; 202: 311-313.

Goldman-Wohl DS, Ariel I, Greenfield C, Hanoch J, Yagel S. HLA-G expression in extravillous trophoblasts is an intrinsic property of cell differentiation: a lesson learned from ectopic pregnancies. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 535-540.

Gonzalez C, Parra A, Ramirez-Peredo J, Garcia C, Rivera JC, Macotela Y. Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Lab Invest* 2007; 87: 1009-1017.

Graham CH, Lala PK. Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. *J Cell Physiol* 1991; 148: 228-234.

Graham CH, Hawley TS, Hawley RC, 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: 204-211.

Gubbay O, Critchley HOD, Bowen JM, King A, Jabbour HN. Prolactin induces ERK phosphorylation in epithelial and CD56⁺ natural killers cells of the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2329-2335.

Haig D. Placental hormones, genomic imprinting, and maternal-fetal communication. *J Evol Biol* 1996; 9: 357-380.

Hamilton GS, Lysiak JJ, Watson AJ, Lala PK. Effects of colony stimulating factor-1 on human extravillous trophoblast growth and invasion. *J Endocrinol* 1998; 159: 69-77.

Hammer A, Dohr G. Expression of Fas-ligand in first trimester and term human placental villi. *J Reprod Immunol* 2000; 46: 83-90.

Hanisch FG, Dressen F, Uhlenbruck G. Quantitative micro-adhesion assay on polystyrene matrices. Lectins and Glycobiology – Quantitative micro-adhesion on polystyrene matrices. New York: Springer-Verlag 1993.

Hannan NJ, Paiva P, Dimitriadis E, Salamonsen LA. Models for study of human embryo implantation: Choice of cell lines? Biol Reprod 2010; 82: 235-245.

Harris LK, Jones CJP, Aplin JD. Adhesion molecules in human trophoblast – A review. II. Extravillous trophoblast. Placenta 2009; 30: 299-304.

Hennighausen L, Robinson GW, Wagner KU, Liu W. Prolactin signaling in mammary gland development. J Biol Chem 1997; 272: 7567-7569.

Hess AP, Hamilton AE, Talbi S, Dosiou C, Nyegard M, Nayak N, Genbacev O, Mavrogianis P, Ferrer K, Kruessel J, Fazleabas AT, Fisher SJ, Giudice LC. Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. Biol Reprod 2007; 76: 102-117.

Hey NA, Aplin JD. Sialyl-Lewis x and Sialyl-Lewis a are associated with MUC I in human endometrium. Glycoconj J 1996; 13: 769-779.

Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. J Natl Cancer Inst 2001; 93: 178-193.

Hirabayashi J, Kasai K. Human placenta β -galactoside-binding lectin purification and some properties. Biochem Biophys Res Commun 1984; 122: 938-944.

Hoang VM, Foulk R, Clauser K, Burlingame A, Gibson BW, Fisher SJ. Functional proteomics: examining the effects of hypoxia on the cytotrophoblast protein repertoire. Biochemistry 2001; 40: 4077-4086.

Horseman ND, Yu-Lee LY. Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. Endocr Rev 1994; 15: 627-649.

Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E, Dorshkind K. Defective mammopoiesis but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J* 1997; 16: 6926-6935.

Hsu DK, Liu FT. Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconj J* 2004; 19: 507-515.

Hu Z-Z, Zhuang L, Guan X, Meng J, Dufau ML. Steroidogenic factor-1 is an essential transcriptional activator for gonad-specific expression of promoter I of the rat prolactin receptor gene. *J Biol Chem* 1997; 272: 14263-14271.

Hu Z-Z, Meng J, Dufau ML. Isolation and characterization of the novel forms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11. *J Biol Chem* 2001; 276: 41086-41094.

Huang JR, Tseng L, Bischof P, Janne OA. Regulation of prolactin production by progesterin, estrogen, and relaxin in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 1987; 121: 2011-2017.

Huber AV, Saleh L, Bauer S, Husslein P, Knöfler M. TNFalpha-mediated induction of PAI-1 restricts invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells. *Placenta* 2006; 27: 127-136.

Hull KL, Harvey S. Growth hormone. Roles in female reproduction. *J Endocrinol* 2001; 168: 1-23.

Huisman MA, Timmer A, Zeinstra M, Serlier EK, Hanemaaijer R, Goor H, Erwich JJ. Matrix-metalloproteinase activity in first trimester placental bed biopsies in further complicated and uncomplicated pregnancies. *Placenta* 2004; 25: 253-258.

Hunt JS. Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells. *J Reprod Immunol* 1989; 16: 1-17.

Huppertz B, Frank HG, Kingdom JC, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol* 1998; 110: 495-508.

Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res* 1998; 291: 133-148.

Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JC. Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 29-39.

Hurskainen T, Hoyhtya M, Tuuttila A, Oikarinen A, Autio-Harmainen H. mRNA expression of TIMP-1, -2, and -3 and 92-kD type IV collagenase in early human placenta and decidual membrane as studied by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 1379-1388.

Hustin J, Schaaps JP, Lambotte R. Anatomical studies of the utero-placental vascularisation in the first trimester of pregnancy. *Troph Res* 1987; 3: 49-60.

Hyytiäinen M, Keski-Oja J. Latent TGF- β binding protein LTBP-2 decreases fibroblast adhesion to fibronectin. *J Cell Biol* 2003; 163: 1363-1374.

Igout A, Scippo ML, Frankenne F, Hennen G. Expression and secretion of the human placental growth hormone in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 3998.

Ingraham HA, Flynn SE, Voss JW, Albert VR, Kapiloff MS, Wilson L, Rosenfeld MG. The POU-specific domain of Pit-1 is essential for sequence-specific, high affinity DNA binding and DNA-dependent Pit-1-Pit-1 interactions. *Cell* 1990; 61: 1021-1033.

Irving JA, Lala PK: Decidual-derived IGFBP-1 stimulates human intermediate trophoblast migration by binding to the $\alpha 5/\beta 1$ integrin subunits. *Placenta* 1994; 15: A31.

Irving JA, Lala PK. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II and IGFBP-I. *Exp Cell Res* 1995; 217: 419-427.

Irving JA, Lysiak JJ, Graham CH, Hearn S, Han VK, Lala PK. Characteristics of trophoblast cells migrating from first trimester chorionic villus explants and propagated in culture. *Placenta* 1995; 16: 413-433.

Isaka K, Usuda S, Ito H, Sagawa Y, Nakamura H, Nishi H, Suzuki Y, Li YF, Takayama M. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta* 2003; 24: 53-64.

Jabbour HN, Critchley HOD, Boddy SC. Expression of functional prolactin receptors in nonpregnant human endometrium: janus kinase-2, signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1), and STAT5 proteins are phosphorylated after stimulation with prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2545-2553.

Jabbour HN, Critchley HOD. Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. *Reproduction* 2001; 121: 197-205.

James JL, Stone PR, Chamley LW. The regulation of trophoblast differentiation by oxygen in the first trimester of pregnancy. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 137-144.

Jauniaux E, Watson A, Burton G. Evaluation of respiratory gases and acid-base gradients in human fetal fluids and uteroplacental tissue between 7 and 16 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 998-1003.

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: 1165-1173.

Jikihara H, Handwerger S. Tumor necrosis factor- α inhibits the synthesis and release of human decidual prolactin. *Endocrinology* 1994; 134: 353-357.

Jones RL, Critchley HO, Brooks, J, Jabbour HN, McNeilly AS. Localisation and temporal pattern of expression of prolactin receptor in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 258-262.

Jones RL, Findlay JK, Farnworth PG, Robertson DM, Wallace E, Salamonsen LA. Activin A and inhibin A differentially regulate human uterine matrix metalloproteinases: potential interactions during decidualization and trophoblast invasion. *Endocrinology* 2006; 147: 724-732.

Jovanović M, Vićovac L. Interleukin-6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line. *Placenta* 2009; 30: 320-328.

Jovanović M, Stefanoska I, Radojčić L, Vićovac L. Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins α_5 and β_1 . *Reproduction* 2010; 139: 789-798.

Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1993; 120: 577-585.

Kanda Y, Jikihara H, Markoff E, Handwerger S. Interleukin-2 inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 667-681.

Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 1991; 12: 235-251.

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 site. *Histochem Cell Biol* 2002; 117: 401-414.

Khurana S, Liby K, Buckley AR, Ben-Jonathan N. Proteolysis of human prolactin: Resistance to cathepsin D and formation of a nonangiostatic, C-terminal 16K fragment by thrombin. *Endocrinology* 1999; 140: 4127-4132.

Kim J, Luo W, Chen DT, Earley K, Tunstead J, Yu-Lee LY, Lin SH. Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 386-393.

Kinet S, Goffin V, Mainfroid V, Martial JA. Characterization of lactogen receptor binding site 1 of human prolactin. *J Biol Chem* 1996; 271: 14353-14360.

King A, Wellings V, Gardner L, Loke YW. Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Immunol* 1989; 24: 195-205.

King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 28-36.

King A, Thomas L, Bischof P. Cell culture models of trophoblast II: trophoblast cell lines-a workshop report. *Placenta* 2000; 1 Suppl A: S113-119.

Klentzeris LD, Bulmer JN, Warren MA, Morrison L, Li TC, Cooke ID. Lymphoid tissue in the endometrium of women with unexplained infertility morphometric and immunohistochemical aspects. *Hum Reprod* 1994; 9: 646-652.

Kline JB, Roehrs H, Clevenger CV. Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. *J Biol Chem* 1999; 274: 35461-35468.

Kline JB, Rycyzyn MA, Clevenger CV. Characterization of a novel and functional human prolactin receptor isoform (Δ S1PRLr) containing only one extracellular fibronectin-like domain. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 2310-2322.

Klinet S, Bernichtein S, Kelly PA, Martial JA, Goffin V. Biological properties of human prolactin analogs depend not only on global hormone affinity, but also on the relative affinities of both receptor binding sites. *J Biol Chem* 1999; 274: 26033-26043.

Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. *Placenta* 1998; 19: 21-26.

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.

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: 569-581.

Kossiakoff AA, Somers W, Ultsch M, Androw K, Muller YA, De Vos AM. Comparison of the intermediate complexes of human growth hormone bound to the human growth hormone and prolactin receptors. Protein Sci 1994; 3: 1697-1705.

Kurman RJ, Main CS, Chen HC. Intermediate trophoblast a distinctive form of trophoblast with specific morphological, biochemical and functional features. Placenta 1984; 5: 349-369.

Labriola L, Ferreira GB, Montor WR, Demasi MAA, Pimenta DC, Lojudice FH, Genzini T, Goldberg AC, Eliaschewitz FG, Sogayar MC. Prolactin-induced changes in protein expression in human pancreatic islets. Mol Cellul Endocrinol 2007; 264: 16-27.

Lacey H, Haigh T, Westwood M, Aplin JD. Mesenchymally-derived insulin-like growth factor 1 provides a paracrine stimulus for trophoblast migration. BMC Dev Biol 2002; 24: 5.

Lacroix M-C, Guibourdenche J, Fournier T, Laurendeau I, Igout A, Goffin V, Pantel J, Tsatsaris V, Evan-Brion D. Stimulation of human trophoblast invasion by placental growth hormone. Endocrinology 2005; 146: 2434-2444.

Lafrenie RM, Yamada KM. Integrin-dependent signal transduction. J Cell Biochem 1996; 61: 543-553.

Lala PK, Lee BP, Xu G, Chakraborty C. Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression. Can J Physiol Pharmacol 2002; 80: 142-149.

Lala PK, Chakraborty C. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury. *Placenta* 2003; 24: 575-587.

Lash GE, Otun HA, Innes BA, Bulmer JN, Searle RF, Robson SC. Inhibition of trophoblast cell invasion by TGF β 1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases. *Biol Reprod* 2005; 73: 374-381.

Laud K, Gourdou I, Belair L, Peyrat J-P, Djiane J. Characterization and modulation of a prolactin receptor mRNA isoform in normal and tumoral human breast tissues. *Int J Cancer* 2000; 85: 771-776.

Leach RE, Kilburn BA, Wang J, Liu Z, Romero R, Armant DR. Heparin binding EGF-like growth factor regulates human extravillous cytotrophoblast development during conversion to the invasive phenotype. *Dev Biol* 2004; 266: 223-237.

Leburn JJ, Ali S, Ullrich A, Kelly PA. Proline-rich sequence-mediated JAK2 association to the prolactin receptor is required but not sufficient for signal transduction. *J Biol Chem* 1995; 270: 10664-10670.

Leburn JJ, Ali S, Goffin V, Ullrich A, Kelly PA. A single phosphotyrosine residue of the prolactin receptor is responsible for activation of gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4031-4035.

Lee DW, Markoff E. Synthesis and release of glycosylated prolactin by human decidua in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 990-993.

Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J* 2004; 19: 433-440.

Lefranc F, Mijatovic T, Decaestecker C, Kaltner H, André S, Brotchi J, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R. Monitoring the expression profiles of integrins and adhesion/growth-regulatory galectins in adamantinomatous craniopharyngiomas: their ability to regulate

tumor adhesiveness to surrounding tissue and their contribution to prognosis. *Neurosurgery* 2005; 56: 763-776.

Lessey BA. The role of the endometrium during embryo implantation. *Hum Reprod* 2000; 15: 39-50.

Levy R, Smith SD, Chandler K, Sadovsky Y, Nelson DM. Apoptosis in human cultured trophoblasts is enhanced by hypoxia and diminished by epidermal growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: C982-988.

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.

Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galardy R, Damsky CH, Fisher SJ. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblast. *J Cell Biol* 1991; 113: 437-449.

Lim KH, Zhou Y, Janatpour M, McMaster M, Bass K, Chun SH, Fisher SJ. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in preeclampsia. *Am J Pathol* 1997; 151: 1809-1818.

Liu FT. Galectins: a new family of regulators of inflammation. *Clin Immunol* 2000; 97: 79-88.

Liu AX, Jin F, Zhang WW, Zhou TH, Zhou CY, Yao WM, Qian YL, Huang HF. Proteomic analysis on the alternation of protein expression in the placental villous tissue of early pregnancy loss. *Biol Reprod* 2006; 75: 414-420.

Llovera M, Pichard C, Bernichtein S, Jeay S, Touraine P, Kelly PA, Goffin V. Human prolactin (hPRL) antagonists inhibit hPRL-activated signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. *Oncogene* 2000; 19: 148-155.

Loke YW, King A. Human Implantation: Cell Biology and Immunology. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

Lopata A, Bentin-Ley U, Enders A. "Pinopodes" and Implantation. Rev Endocr Metab Disord 2002; 3: 77-86.

Lopez-Lucendo MF, Solis D, Andre S, Hirabayashi J, Kasai K, Kaltner H, Gabius HJ, Romero A. Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. J Mol Biol 2004; 343: 957-970.

Lowman HB, Cunningham BC, Wells JA. Mutational analysis and protein engineering of receptor-binding determinants in human placental lactogen. J Biol Chem 1991; 266: 10982-10988.

Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. Reprod Biol Endocrinol 2007; 5: 1-14.

Maaskant RA, Bogic LV, Gilger S, Kelly PA, Bryant-Greenwood GD. The human prolactin receptor in the fetal membranes, decidua, and placenta. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 396-405.

Manzella SM, Dharmesh SM, Cohick CB, Soares MJ, Baenziger JU. Developmental regulation of a pregnancy-specific oligosaccharide structure, NeuAc α 2, 6GalNAc β 1, 4GlcNAc on select members of the rat placental prolactin family. J Biol Chem 1997; 272: 4775-4782.

Maquoi E, Polette M, Nawrocki B, Bischof P, Noel A, Pintiaux A, Birembaut P, Basset P, Foidart JM. Expression of stromelysin-3 in the human implantation placental site. Placenta 1995; 16: A 46.

Maqui E, van de 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: 433-439.

Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA, Weiner RI. The anti-angiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 1536-1549.

Maslar IA, Ansbacher R. Effects of progesterone on decidual prolactin production by organ cultures of human endometrium. *Endocrinology* 1986; 118: 2102-2108.

Maslar IA, Riddick DH. Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135: 751-754.

Maus MV, Reilly SC, Clevenger CV. Prolactin as a chemoattractant for human breast carcinoma. *Endocrinology* 1999; 140: 5447-5450.

Miller WL, Coit D, Baxter JD, Martial JA. Cloning of bovine prolactin cDNA and evolutionary implications of its sequence. *DNA* 1981; 1: 37-50.

Miller WL, Eberhardt NL. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr Rev* 1983; 4: 97-130.

Mirlesse V, Frankenne F, Alsat E, Poncelet M, Hennen G, Evain-Brion D. Placental growth hormone levels in normal pregnancy and in pregnancies with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 1993; 34: 439-442.

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.

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: 125-132.

Montagnana M, Lippi G, Albiero A, Scevarolli S, Salvagno GL, Franchi M. Evaluation of metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors in physiologic and pre-eclamptic pregnancy. *J Clin Lab Anal* 2009; 23: 88-92.

Montes de Oca P, Macotela Y, Nava G, López-Barrera F, Martinez de la Escalera G, Clapp C. Prolactin stimulates integrin- mediated adhesion of circulating mononuclear cells to endothelial cells. *Lab Invest* 2005; 85: 633-642.

Muhlhauser J, Crescimanno C, Kaufmann P, Hofler 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: 165-173.

Murray MJ, Lessey BA. Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Med* 1999; 17: 275-290.

Nagano M, Kelly PA. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression: quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J Biol Chem* 1994; 269: 13337-13345.

Nagano M, Chastre E, Chiquet A, Bara J, Gespach C, Kelly PA. Expression of prolactin and growth hormone receptor genes and their isoforms in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 1995; 268: G431-G442.

Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1991; 274: 21491-21494.

Nawrocki B, Polette M, Marchand V, Maquoi E, Beorchia A, Tournier JM, Foidart JM, Birenbaut P. Membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression at the site of human placentation. *Placenta* 1996; 17: 565-572.

Neville MC, Daniel CW. The mammary gland: Development regulation and function. New York: Plenum Press, 1987.

Nio-Kobayashi J, Iwanaga T. Galectin-1 and galectin-3 in the corpus luteum of mice are differentially regulated by prolactin and prostaglandin F2 α . *Reproduction* 2012; 144: 617-624.

Niu R, Okamoto T, Iwase K, Nomura S, Mizutani I. Quantitative analysis of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their tissue inhibitors-1 and -2 in human placenta through gestation. *Life Sciences* 2000; 66: 1127-1137.

Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001; 345: 1400-1408.

Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruiz C, Olivares EG. Human decidual stromal cells express alpha-smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod* 1999; 14: 1599-1605.

O'Neal KD, Yu Lee L. Differential signal transduction of the short, Nb2, and long prolactin receptors. *J Biol Chem* 1994; 269: 26076-26082.

Orwig KE, Rasmussen CA, Soares MJ. Decidual signals in the establishment of pregnancy: the prolactin family. *Trophoblast Res* 1997; 10: 329-343.

Owerbach D, Rutter WJ, Cooke NE, Martial JA, Shows TB. The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science* 1981; 212: 815-816.

Parham P. NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. *J Exp Med* 2004; 200: 951-955.

Parra A, Ramirez-Peredo J. The possible role of prolactin in preeclampsia: 2001, a hypothesis revisited a quarter of century later. *Med Hypotheses* 2002; 59: 378-384.

Patel L, Charlton Sj, Chambers JK. Expression and functional analysis of chemokine receptors in human peripheral blood leukocyte populations. *Cytokine* 2001; 14: 27-36.

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.

Pijnenborg R. Implantation and immunology: maternal inflammatory and immune cellular responses to implantation and trophoblast invasion. *Reprod Biomed Online* 2002; 4(Suppl 3): 14-17.

Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 2006; 27: 939-958.

Poirier F, Timmons PM, Chan CT, Guenet JL, Rigby PWJ. Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development. *Development* 1992; 115: 143-155.

Polette M, Nawrocki B, Pintiaux A, Massenat C, Maquoi E, Volders L, Schaaps JP, Birembaut P, Foidart JM. Expression of gelatinases A and B and their tissue inhibitors by cells of early and term human placenta and gestational endometrium. *Lab Invest* 1994; 71: 838-846.

Poon LC, Nekrasova E, Anastassopoulos P, Livanos P, Nicolaides KH. First trimester maternal serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 2009; 29: 553-559.

Psychoyos A. The "implantation window": can it be enlarged or displaced? *Excerpta Med Int Congr Ser* 1988; 768: 231-232.

Puistola U, Ronnberg L, Martikainen H, Turpeenniemi-Hujanen T. The human embryo produces basement membrane collagen (Type IV collagen)-degrading protease activity. *Hum Reprod* 1989; 4: 309-311.

Qazi AM, Tsai-Morris C-H, Dufau ML. Ligand-independent homo- and heterodimerization of human prolactin receptor variants: inhibitory action of the short forms by heterodimerization. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 1912-1923.

Quelle DE, Quelle FW, Wojchowski DM. Mutations in the WSAWSE and cytosolic domains of the erythropoietin receptor affect signal transduction and ligand binding and internalization. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 4553-4561.

Quenby S, Farquharson R. Uterine natural killer cells, implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 24-28.

Rabinovich GA. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ* 1999; 6: 711-721.

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. *J Clin Invest* 2004; 114: 744-754.

Redline RW, Patterson P. Pre-eclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast. *Hum Pathol* 1995; 26: 594-600.

Reuwer AQ, Reuwer PJHM, van der Post JA, Cramer MJ, Kastelein JJP, Twickler MTB. Prolactin fragmentation by trophoblastic matrix metalloproteinases as a possible contributor to peripartum cardiomyopathy and pre-eclampsia. *Med Hypothes* 2010; 74: 348-352.

Rhodes SJ, DiMattia GE, Rosenfeld MG. Transcriptional mechanisms in anterior pituitary cell differentiation. *Curr Opin Gen Develop* 1994; 4: 709-717.

Riddick DH, Luciano AA, Kusmik WF, Maslar IA. De novo synthesis of prolactin by human decidua. *Life Sci* 1978; 23: 1913-1921.

Riddick DH, Luciano AA, Kusmik WF, Maslar IA. Evidence for a nonpituitary source of amniotic fluid prolactin. *Fertil Steril* 1979; 31: 35-39.

Riddle O, Bates RW, Dykshorn SW. The preparation, identification and assay of prolactin – a hormone of the anterior pituitary. *Am J Physiol* 1933; 105: 191-216.

Risk M, Gibori G. Mechanisms of luteal cell regulation by prolactin. Ed Horseman ND. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2001; 265-295.

Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 1992; 80: 283-285.

Rosenberg M, Mazella J, Tseng L. Relative potency of relaxin, insulin-like growth factors, and insulin on the prolactin production in progestin-primed human endometrial stromal cells in long-term culture. *Ann New York Acad Sci* 1991; 622: 138-144.

Ruck P, Marzusch K, Horny HP, Dietl J, Kaiserling E. The distribution of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in the human placenta. *Placenta* 1996; 17: 263-266.

Sadler TW. Langman's Medical Embryology 11th. Ed Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

Saito S. Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta. *J reprod Immunol* 2001; 52: 15-33.

Saito S, Sakai M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2003; 59: 161-173.

Sakbun Y, Ali SM, Lee YA, Jara CS, Bryant-Greenwood GD. Immunocytochemical localization and messenger ribonucleic acid concentrations for human placental lactogen in amnion, chorion, decidua, and placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 1310-1317.

Salamonsen LA, Dimitriadis E, Jones RL, Nie G. Complex regulation of decidualization: a role for cytokines and proteases – a review. *Placenta* 2003; Suppl A: S76-S85.

Scippo ML, Frankenne F, Hooghe-Peters EL, Igout A, Velkeniers B, Hennen G. Syncytiotrophoblastic localization of the human growth hormone variant mRNA in the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 92: R7-13.

Shao R, Nutu M, Weijdegard B, Egecioglu E, Fernandez-Rodriguez J, Tallet E, Goffin V, Ling C, Billig H. Differences in prolactin receptor (PRLR) in mouse and human fallopian tubes: Evidence for multiple regulatory mechanisms controlling PRLR isoform expression in mice. *Biol Reprod* 2008; 79: 748-757.

Sinha YN, Gilligan TA, Lee DW, Hollingsworth D, Markoff E. Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60: 239-243.

Sinha YN. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 1995; 16: 354-369.

Smith CR, Norman MR. Prolactin and growth hormone: molecular heterogeneity and measurement in serum. *Ann Clin Biochem* 1990; 27: 542-550.

Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 1395-1401.

Soares MJ, Faria TN, Roby KF, Deb S. Pregnancy and the prolactin family of hormones: coordination of anterior pituitary, uterine, and placental expression. *Endocr Rev* 1991; 12: 402-423.

Solomon G, Reicher S, Gussakovsky EE, Joman J-B, Gertler A. Large-scale preparation and *in vitro* characterization of biologically active human placental (20 and 22K) and pituitary (20K) growth hormones: Placental growth hormones have no lactogenic activity in humans. *Growth Hormon IGF Res* 2006; 16: 297-307.

Somers W, Ultsch M, De Vos AM, Kossiakoff AA. The X-ray structure of the growth hormone-prolactin receptor complex. *Nature* 1994; 372: 478-481.

Starkey PM, Sargent IL, Redman CW. Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology* 1988; 65: 129-134.

Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 59.

Streuli CH, Edwards GM, Delcommenne M, Whitelaw CB, Burdon TG, Schindler C, Watson CJ. Stat5 as a target for regulation by extracellular matrix. *J Biol Chem* 1995; 270: 21639-21644.

Stricker P, Grueter R. Action du lobe anterieur de l'hypophyse sur la montée laiteuse. *C R Soc Biol* 1928; 99: 1978-1980.

Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *PNAS* 1999; 96: 1246-1251.

Tan D, Chen KHE, Khoo T, Walker AM. Prolactin increases survival and migration of ovarian cancer cells: Importance of prolactin receptor type and therapeutic potential of S179D and G129R receptor antagonists. *Cancer Lett* 2011; 310: 101-108.

Tarrade A, Lai Kuen R, Malassiné A, Tricottet V, Blain P, Vidaud M, Evain-Brion D. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest* 2001; 81: 1199-1211.

Telgmann R, Gellersen B. Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 472-479.

Terra LF, Garay-Malpartida MH, Wailemann RAM, Sogayar MC, Labriola L. Recombinant human prolactin promotes human beta cell survival via inhibition of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Diabetologia* 2011; 54: 1388-1397.

Thathiah A, Brayman M, Dharmaraj N, Julian JJ, Lagow EL, Carson DD. Tumor necrosis factor alpha stimulates MUC I synthesis and ectodomain release in a human uterine epithelial cell line. *Endocrinology* 2004; 145: 4192-4203.

Thirkill TL, Douglas GC. The vitronectin receptor plays a role in the adhesion of human cytotrophoblast cells to endothelial cells. *Endothelium* 1999; 6: 277-290.

Tominaga T, Page EW. Accommodation of the human placenta to hypoxia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 94: 679-691.

Tomita K, McCoshen JA, Fernandez CS, Tyson JE. Immunologic and biologic characteristics of human decidual prolactin. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 142: 420-426.

Trott JF, Hovey RC, Koduri S, Vonderhaar BK. Alternative splicing to exon 11 of human prolactin receptor gene results in multiple isoforms including a secreted prolactin-binding protein. *J Mol Endocrinol* 2003; 30: 31-47.

Truong AT, Duez C, Belayew A, Renard A, Pictet R, Bell GI, Martial JA. Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J* 1984; 3: 429-437.

van de 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: 377-386.

van de Brule F, Califice S, Castronovo V. Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J* 2004; 19: 537-542.

Vettraino IM, Roby J, Tolley T, Parks WC. Collagenase-1, stromelysin-1, and matrilysin are expressed within the placenta during multiple stages of human pregnancy. *Placenta* 1996; 17: 557-563.

Vincent V, Goffin V, Rozakis-Adcock M, Mornon JP, Kelly PA. Identification of cytoplasmic motifs required for short prolactin receptor internalization. *J Biol Chem* 1997; 272: 7062-7068.

Vićovac L, Genbacev O. Coincubation-an experimental approach to the study of decidual-trophoblast interaction. *Placenta* 1988; 9: 109-115.

Vićovac L, Starkey PM, Aplin JD. Comment: effect of cytokines on prolactin production by human decidual stromal cells in culture: studies using cells freed of bone marrow-derived contaminants. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1877-1882.

Vićovac L, Jones CJP, Aplin JD. Trophoblast differentiation during formation of anchoring villi in a model of the early human placenta in vitro. *Placenta* 1995; 16: 41-56.

Vićovac L, Aplin JD. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta anatomica* 1996; 1-15.

Vićovac L, Janković M, Čuperlović M. Galectin-1 and -3 in cells of the first trimester placental bed. *Hum Reprod* 1998; 13: 730-735.

Vićovac L, Božić M, Bojić-Trbojević Z, Golubović S. Carcinoembryonic antigen and related molecules in normal and transformed trophoblast. *Placenta* 2007; 28: 85-96.

Vigano P, Mangioni S, Pompei F, Chiodo I. Maternal-conceptus Cross Talk – A Review. *Placenta* 2003; 24: S56-S61.

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: 189-194.

Wakao H, Gouilleux F, Groner B. Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J* 1994; 13: 2182-2191.

Walker WH, Fitzpatrick SL, Barrera-Saldana HA, Resendez-Perez D, Saunders GF. The human placental lactogen genes: structure, function, evolution and transcriptional regulation. *Endocr Rev* 1991; 12: 316-328.

Walker AM. Phosphorylated and nonphosphorylated prolactin isoforms. *Trends Endocrinol Metab* 1994; 5: 195-200.

Walker SE, Miller D, Hill DL, Komatireddy GR. Prolactin, a pituitary hormone that modifies immune responses. Proceedings of the Mini-symposium on prolactin and SLE, held at the 5th International Conference on Systemic Lupus Erythematosus, Cancun, Mexico. *Lupus* 1998; 7: 371-375.

Wang D, Ishimura R, Walia DS, Müller H, Dai G, Hunt JS, Lee NA, Lee JJ, Soares MJ. Eosinophils are cellular targets of the novel uteroplacental heparin-binding cytokine decidual/trophoblast prolactin-related protein. *J Endocrinol* 2000; 167: 15-28.

Waters MJ, Shang CA, Behncken SN, Tam S-P, Li H, Shen B, Lobie PE. Growth hormone as a cytokine. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 760-764.

Wells JA, De Vos AM. Hematopoietic receptor complexes. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 609-634.

Wu WX, Brooks J, Glasier AF, McNeilly AS. The relationship between decidualisation and prolactin mRNA and production at different stages of human pregnancy. *J Mol Endocrinol* 1995; 14: 255-261.

Wu W, Coss D, Lorenson MY, Kuo CB, Xu X, Walker AM. Different biological effects of unmodified prolactin and a molecular mimic of phosphorylated prolactin involve different signaling pathways. *Biochemistry* 2003; 42: 7561-7570.

Xu P, Wang YL, Zhu SJ, Luo SY, Piao YS, Zhuang LZ. Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14, tissue inhibitors of metalloproteinase-1, and matrix proteins in human placenta during the first trimester. *Biol Reprod* 2000; 62: 988-994.

Yamada KM, Geiger B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 187.

Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinases-9 proteolytically activates THF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000; 14: 163-176.

Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest* 1993; 91: 950-960.

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: 2139-2151.

BIOGRAFIJA AUTORA

Mr Ivana M. Stefanoska, istraživač saradnik, rođena je 20.01.1970. godine u Beogradu. Diplomirala je 1998. godine na Biološkom fakultetu u Beogradu sa prosečnom ocenom 9,05. Upisala je poslediplomske studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Imunohemija, i realizovala eksperimentalni deo magistarske teze u Institutu za medicinska istraživanja VMA. Odbranila je magistarsku tezu i stekla zvanje magistra farmaceutskih nauka. Od 2007. godine zaposlena je u Institutu za primenu nuklearne energije - INEP, gde se bavi istraživanjima iz oblasti reproduktivne biologije, a u zvanje istraživač saradnik izabrana je 2007. godine.

Od 2007. do 2010. godine bila je angažovana na projektu „Ćelijske interakcije i molekularni mehanizmi u diferencijaciji ćelija u implantaciji embriona i placentaciji“ finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Trenutno je uključena u projekat „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 uradila 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 bila autor ili koautor u 9 naučnih publikacija (7 u međunarodnim i 2 u domaćim časopisima), kao i u 7 saopštenja na međunarodnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани мр Ивана М. Стефаноска

број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај пролактина на ћелије

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, 12. 04. 2013.

И. Стефаноска

Изјава о коришћењу

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

„Утицај пролактина на ћелије

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, 12.04.2013.

И. Сидељаноски