



UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET



**UTICAJ PLACENTALNOG HORMONA RASTA I
INSULINU SLIČNOG FAKTORA RASTA 1 NA
GLOMERULE BUBREGA MIŠEVA ROĐENIH SA
INTRAUTERUSNOM RESTRIKCIJOM RASTA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
Prof. dr Vesna Stojanović

Kandidat:
dr Nataša Stašuk

Novi Sad, 2022. godine

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Наташа Сташук
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Проф.др Весна Стојановић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду, ИЗЗЗДИОВ Нови Сад
Наслов рада:	Утицај плаценталног хормона раста и инсулину сличног фактора раста 1 на гломеруле бубрега мишева рођених са интраутерусном рестрикцијом раста
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница: 96 Поглавља: 7 Референци: 251 Табела: 13 Слика: 20 Графикона: 12 Прилога: -
Научна област:	Медицина
Ужа научна област (научна дисциплина):	Педијатрија/неонатологија
Кључне речи / предметна одредница:	нефрони; гломерули бубрега; интраутерина рестрикција раста; хипертензија; хронична бубрежна инсуфицијенција; инсулину сличан фактор раста 1; хормон раста; плацентални хормони; креатинин; цистатин Ц; животињски модели; мишеви
Резиме на језику рада:	Неонатуси који су ин утеро изложени аберантним феталним, матерналним или плаценталним факторима који коче правилан раст и развој фетуса припадају високоризичној групи новорођенчади са интраутерусном рестрикцијом раста (ИУГР). Према концепту развојног програмирања хроничних болести, дугорочне консеквенце ИУГР се протежу до одраслог доба. Патопфизиолошки механизми овог процеса су вишеструки и делимично разјашњени, али се зна да смањени број нефрона на рођењу код ИУГР потомака изазива компензаторну хипертрофију гломерула и покреће патолошке механизме који могу условити развој хипертензије и хроничну бубрежну инсуфицијенцију. Циљ студије је да се на експерименталном моделу интраутерусне рестрикције раста код мишева испита да ли ИУГР утиче на смањење броја гломерула мишева, да ли давање плаценталног хормона раста (ПГХ) и инсулину сличног фактора раста 1 (ИГФ1) у различитим дозама

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штапане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штапаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

	<p>утиче на повећање броја и величине гломерула и да ли је бубрежна функција мишева са ИУГР, који су након рођења добили ПГХ и ИГФ1, у адултној доби када су жртвовани, боља у односу на оне који нису добили ПГХ и ИГФ1.</p> <p>Метод: Коришћен је експериментални модел ИУГР у коме су гравидне женке добијале дексаметазон у дози од 100µг/кг/дан супкутано од 15-21. дана гестације, тј. до дана порођаја. По методи случајног избора младунци су разврстани у једну од шест група, по десет мишева у свакој и остављени на природној исхрани. Жртвовани су након месец дана. Из срца се узело 0,5мл крви за анализу концентрације цистатина Ц и креатинина, а потом је код сваке жртвоване јединке одстрањен по један бубрег. Хистолошком обрадом су добијене плочице које су анализирани уз помоћ дигиталног микроскопа, скениране и преведене у дигиталну форму. Употребом софтверских система израчуната је нумеричка густина и волумен гломерула сваке групе појединачно, у све три зоне коре бубрега.</p> <p>Резултати: Мишеви код којих је експериментом изазван ИУГР су имали мањи број гломерула у односу на контролну групу (27.700 vs 36.111). У групи мишева који су добили већу дозу ИГФ1 (10µг) је био повећан и број и волумен гломерула, а концентрација креатинина најнижа у односу на све остале групе, са статистички значајном разликом ($p < 0,033$) у односу на контролну групу без интервенције. Давање мање дозе ИГФ1 (1µг), као и давање мање (2µг) и веће (10µг) дозе ПГХ није изазвало повећање броја и волумена гломерула. Давање 10µг ПГХ је довело до смањеног броја гломерула у површинској и интермедијарној зони са статистички значајном разликом ($p < 0,05$) у односу на групу која је добила 10µг ИГФ1 и контролну групу без интервенције, као и до смањења волумена гломерула са статистички значајном разликом ($p < 0,05$) у односу на групу која је добила 10µг ИГФ1. Анализа цистатина Ц је слична у свим испитиваним групама.</p> <p>Закључак: Већа доза ИГФ1 (10µг) повећава нумеричку густину и волуменску фракцију гломерула, али су потребне дугорочне студије и на животињским моделима и на хуманој популацији да утврде да ли ће у старости гломерулосклероза и последична хронична бубрежна инсуфицијенција пре наступити код ИУГР потомака који након рођења нису добили ИГФ1 у односу на оне који су добили ИГФ1, тј. да ли апликовање ИГФ1 након рођења ИУГР потомци има протективно дејство и може дуже да очува функцију њихових бубрега. У доступној литератури нема података о истраживањима дејства ПГХ на гломеруле ИУГР потомства, те су потребна даља испитивања да би се добили релевантни подаци о патофизиолошком дејству ПГХ.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	26.11.2019.
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	Председник: Члан: Члан: Члан:
Напомена:	

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Nataša Stašuk
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Prof.dr Vesna Stojanović, full professor, Institut for Health Care of Children and Youth of Vojvodina, Novi Sad
Thesis title:	Effect of Placenta Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor 1 on kidney glomeruli of mice born with intrauterine growth restrictions
Language of text (script):	Serbian language (latin script)
Physical description:	Number of: Pages: 96 Chapters: 7 References: 251 Tables: 13 Illustrations: 20 Graphs: 12 Appendices: -
Scientific field:	Medicine
Scientific subfield (scientific discipline):	Pediatrics – Neonatology
Subject, Key words:	Nephrons; Kidney Glomerulus; Fetal Growth Retardation; Hypertension; Renal Insufficiency, Chronic; Insulin-Like Growth Factor I; Growth Hormone; Placental Hormones; Creatinine; Cystatin C; Models, Animal; Mice
Abstract in English language:	Objectives: Neonates that were in utero subject to aberrant fetal, maternal or placental factors that retard normal growth and development of the fetus are considered a high-risk group of newborns with intrauterine growth restriction (IUGR). According to the concept of developmental programming of chronic illness, long term consequences of IUGR are present up until adulthood. Pathophysiological mechanisms of this process are manifold and only partially understood, but it is accepted that lowered nephron number at birth in IUGR offspring causes compensatory hypertrophy of glomeruli and initiates pathological mechanisms that can cause the development of hypertension and chronic kidney failure. The aim of the study is to investigate, using an experimental model of intrauterine growth restriction in mice, whether IUGR affects the decrease in the number of glomeruli in mice, whether the administration of placental growth hormone (PGH) and insulin-like growth factor 1 (IGF1) in different doses affects the increase in number and size glomeruli and whether the

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5b – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

	<p>kidney function of mice with IUGR, which received PGH and IGF1 after birth, in adulthood when they were sacrificed, is better compared to those that did not receive PGH and IGF1.</p> <p>Methods: An experimental model of IUGR was used in which pregnant females received dexamethasone at a dose of 100µg/kg/day subcutaneously from 15-21. days of gestation, i.e. until the day of delivery. According to the method of random selection, the cubs were divided into one of six groups, ten mice in each, and left on natural food. They were sacrificed after a month. 0.5 ml of blood was taken from the heart for analysis of cystatin C and creatinine concentration, and then one kidney was removed from each sacrificed individual. Plates were obtained through histological processing, which were analyzed with the help of a digital microscope, scanned and translated into digital form. Using software systems, the numerical density and volume of the glomeruli of each group was calculated individually, in all three zones of the kidney cortex.</p> <p>Results: Mice with experimentally induced IUGR had a lower number of glomeruli compared to the control group (27,700 vs 36,111). In the group of mice that received a higher dose of IGF1 (10µg), the number and volume of glomeruli increased, and the creatinine concentration was the lowest compared to all other groups, with a statistically significant difference (p<0.033) compared to the control group without intervention. Administration of a lower dose of IGF1 (1 µg), as well as administration of a lower (2 µg) and higher (10 µg) dose of PGH did not cause an increase in the number and volume of glomeruli. The administration of 10 µg of PGH led to a decreased number of glomeruli in the superficial and intermediate zone with a statistically significant difference (p<0.05) compared to the group that received 10 µg of IGF1 and the control group without intervention, as well as to a decrease in the volume of glomeruli with a statistically significant difference (p<0.05) compared to the group that received 10 µg of IGF1. Cystatin C analysis didn't reveal any differences between studied groups.</p> <p>Conclusion: A higher dose of IGF1 (10 µg) increases the numerical density and volume fraction of glomeruli, but long-term studies in both animal models and human populations are needed to determine whether glomerulosclerosis and subsequent chronic renal failure in old age will occur earlier in IUGR offspring that did not receive after birth IGF1, compared to those who received IGF1, ie. whether applying IGF1 after birth to IUGR offspring has a protective effect and can preserve the function of their kidneys longer. In the available literature, there is no data on research on the effect of PGH on the glomeruli of IUGR offspring, and further studies are needed to obtain relevant data on the pathophysiological effect of PGH.</p>
Accepted on Scientific Board on:	26.11.2019.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	President: Member: Member: Member:
Note:	

Zahvalnica

Zahvaljujem se svima koji su mi pružili podršku, pomoć i motivaciju tokom rada na doktorskoj disertaciji.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Razvoj bubrega i građa nefrona	1
1.1.1. Embrionalni razvoj bubrega	1
1.1.2. Građa i zonalna distribucija nefrona	3
1.2. Intrauterusna restrikcija rasta	5
1.2.1. Definicija intrauterusne restrikcije rasta, fetalni rast i metabolizam.....	5
1.2.2. Epidemiologija male telesne mase na rođenju	7
1.2.3. Uzroci IUGR	8
1.2.3.1. Fetalni uzroci IUGR	8
1.2.3.2. Maternalni uzroci IUGR	9
1.2.3.3. Placentalni uzroci IUGR	9
1.2.3.4. Genski uzroci IUGR	10
1.2.4. Klasifikacija IUGR	11
1.2.5. Dijagnoza IUGR	12
1.2.6. Ishod IUGR	14
1.2.7. Fetalno poreklo bolesti odraslog doba	15
1.2.7.1. Hipoteza fetalnog insulina	16
1.2.7.2. Štedljivi genotip	16
1.2.7.3. Štedljivi fenotip (Barkerova hipoteza)	17
1.2.8. Brenerova hipoteza - teorija hiperfiltracije	19
1.2.9. Kliničke konsekvence oštećenog razvojnog programiranja bubrega.....	20
1.3. Animalni modeli fetalne restrikcije rasta	24
1.3.1. Zašto se koriste animalni modeli	24
1.3.2. Razmatranja pri korišćenju animalnih modela u proučavanju IUGR.....	25

1.3.3. Kreiranje animalnog modela fetalne restrikcije rasta.....	26
1.4. Serumski cistatin C i kreatinin kao pokazatelji funkcije bubrega IUGR.....	27
1.5. Placentalni hormon rasta	29
1.5.1. Poreklo PGH	29
1.5.2. PGH sekrecija tokom normalne trudnoće	30
1.5.3. Fiziološka uloga PGH tokom trudnoće	30
1.5.4. PGH i fetalni rast	31
1.6. Insulinu sličan faktor rasta 1	33
1.6.1. Poreklo IGF1	33
1.6.2. Fiziološka uloga IGF1	34
1.6.3. IGF1 i IUGR	38
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I RADNE HIPOTEZE	42
3. MATERIJAL I METODE	43
3.1. Histološka obrada materijala	47
3.2. Digitalizacija histoloških preseka i priprema za morfometrijsku analizu.....	49
3.3. Morfometrijska analiza	49
3.4. Laboratorijska analiza vrednosti kreatinina i cistatina C.....	52
3.5. Statistička obrada podataka	53
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	54
4.1. Histološki presek glomerula i morfometrijska analiza po grupama	54
4.2. Analiza numeričke gustine (NG) glomerula po grupama ukupno i u tri ispitana sloja kore bubrega: površinska zona (PZ), intermedijarna zona (IMZ), juktamedularna zona (JMZ)	60
4.3. Analiza volumenske frakcije (VF) glomerula po grupama ukupno i u tri ispitana sloja kore bubrega: površinska zona (PZ), intermedijarna zona (IMZ),	

jukstamedularna zona (JMZ)	64
4.4. Analiza vrednosti cistatina C i kreatinina	68
4.3.1. Korelacija između nalaza vrednosti cistatina C i kreatinina	69
4.3.2. Poređenje vrednosti cistatina C po grupama	69
4.3.3. Poređenje vrednosti kreatinina po grupama	70
5. DISKUSIJA	72
6. ZAKLJUČAK	85
7. LITERATURA	86

LISTA SKRAĆENICA:

gn – gestacijska nedelja

IUGR – Intrauterine Growth Restriction (intrauterusna restrikcija rasta)

IGF1 – Insulin Like Growth Factor 1 (insulinu sličan faktor rasta 1)

PGH – Placental Growth Hormone (placentalni hormon rasta)

EGF – Epidermal Growth Factor (epidermalni faktor rasta)

BMI – Body Mass Index (indeks telesne mase)

SGA – Small for Gestational Age (malo za gestacijsku starost)

LBW – Low Birth Weight (mala telesna masa)

EFW – Estimeted Fetal Weight (procenjena telesna masa)

AFI – Amniotic Fluid Index (indeks amnionske tečnosti)

BPP – biofizički profil ploda

OGTT – Oral Glucose Tolerance Test (oralni test opterećenja glukozom)

RAS – renin – angiotenzin sistem

IGFBP – Insulin Like Binding Protein (protein koji vezuje insulinu sličan faktor rasta)

GFR – Glomerular Filtration Rate (jačina glomerulske filtracije)

GH – Growth Hormone (hormon rasta)

CSH – Chorionic Somatomammotropin Hormone (horionski somatomamotropni hormon)

iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina

1. UVOD

1.1. RAZVOJ BUBREGA I GRAĐA NEFRONA

1.1.1. Embrionalni razvoj bubrega

Mokraćni i polni sistem se razvijaju iz zajedničkog intermedijarnog mezoderma. Otvaraju se u zajednički kanal – kloaku, koja se deli na prednji i zadnji deo. Iz prednjeg dela kloake koji se deli na ureteralni pupoljak i pupoljak bešike se razvija urogenitalni sistem. Iz zadnjeg dela kloake formira se gastrointestinalni trakt (1).

Tokom fetalnog razvoja nastaju tri različita bubrežna sistema: pronefros, mezonefros i metanefros. Oni se diferenciraju od cervikalnog ka kaudalnom delu u nefrogenom nizu (2). Pronefros se prvi razvija, početkom 4. nedelje, rudimentaran je i kod ljudskog embriona ne funkcioniše kao ekskretorni organ. Na kraju 4. nedelje potpuno regredira. Nalazi se kod primitivnih riba i larvi amfibija. Indukuje razviće mezonefrosa.

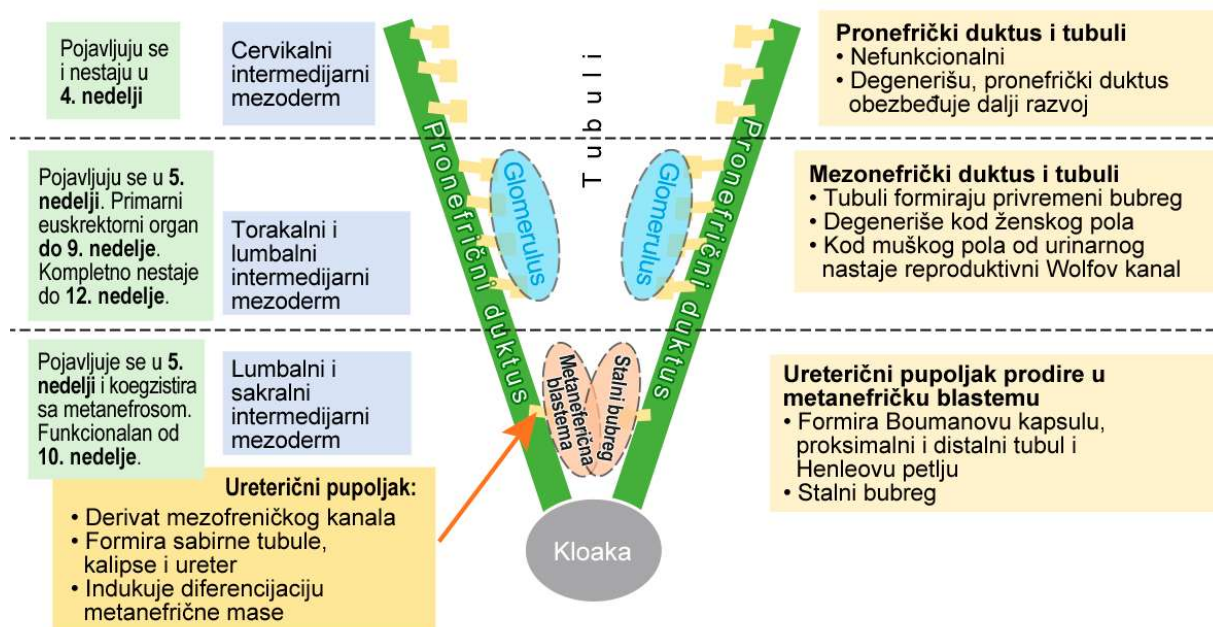
Mezonefros (prabubreg ili Wolffovo telašće) se javlja pri kraju 4. nedelje intrauterusnog razvoja. Oko 9. nedelje, mezonefros uglavnom atrofira. Pronefros i mezonefros predstavljaju prolazne faze u razvoju bubrega i zajedno sa definitivnim bubregom se razvijaju od iste osnove koju čine nefrotomi, odnosno nefrogeni tračak. Razlikuju se jedino po tome što ne nastaju od istih nefrotoma, ni u isto vreme, niti dostižu jednak stepen razvoja. Završni stadijum razvoja bubrega kod čoveka je metanefros.

Metanefros je definitivni bubreg koji se razvija u 5. nedelji od sakralnog segmenta intermedijarnog mezoderma.

Kolektorni kanalići permanentnog bubrega se razvijaju iz pupoljka uretera, odmah pored njegovog ulaska u kloaku. Pupoljak prodire u metanefričko tkivo koje pokriva njegov distalni deo kao kapa, a potom se širi formirajući primitivnu bubrežnu karlicu (pijelon), koja se dalje sukcesivno deli na čašice i 1-3 miliona tubula. Metanefros formira bubreg vertebrata (reptili, ptice i sisari).

Kompletno stvaranje kanalnog sistema se završava u 10. nedelji. Iz ureteralnog pupoljka se definitivno razvijaju ureteri, karlica, čašice i kolektorni sistem. Poremećaji u razvoju prouzrokuju anomalije poput ektopičnog i potkovičastog bubrega, duplikacije bubrega, uretera i donjeg urinarnog trakta.

Obzirom da se poreklo bubrega razlikuje od porekla uretera, patolozi smatraju da se anomalije i patološke promene bubrega takođe razlikuju u odnosu na patološke promene kod uretera (3,4).



Slika 1. Razvoj bubrega hronološki od kranijalnog ka kaudalnom pravcu u tri različite faze

Preuzeto: <https://epomedicine.com/wp-content/uploads/2016/08/renal-embryology-schematic.jpg>

Prvobitni položaj bubrega je u maloj karlici ispred sedalne kosti (sakruma) odakle se bubreg postepeno pomera na gore, ka trbuhu i doseže svoj definitivni položaj u 9. nedelji intrauterusnog razvoja. Pomeranje bubrega na gore (*ascensus renis*) je relativno jer je najvećim delom izazvano rastom embriona kaudalno od bubrega. Prvobitno se hilus bubrega nalazi ventralno, ali se potom rotira za 90° ka srednjoj liniji tela (medijalno) i relokacijom i rotacijom krajem 9. nedelje se pozicionira u svoje definitivno lumbalno i anteromedijalno ležište.

Prvi glomeruli se formiraju između 9. i 10. gestacijske nedelje (gn) (5). Za vreme drugog i trećeg trimestra trudnoće postoji eksponencijalan porast broja nefrona, a njihov razvoj se završava između 32. i 36. gestacijske nedelje (6).

Fetalni urin postaje glavni deo amnionske tečnosti između 16. i 20. gestacijske nedelje u količini od 300ml/kg/dan (7,8).

1.1.2. Građa i zonalna distribucija nefrona

Nefron je osnovna funkcionalna jedinica bubrega. Svaki bubreg pojedinačno sadrži u proseku oko milion nefrona, ali je taj broj promenljiv, od 200.000 do 2,5 miliona, a svaki nefron sam za sebe može stvarati urin. U osnovi, svaki nefron se sastoji od glomerula u kome se tečnost filtrira iz krvi i tubula u kome se filtrirana tečnost pretvara u urin (6).

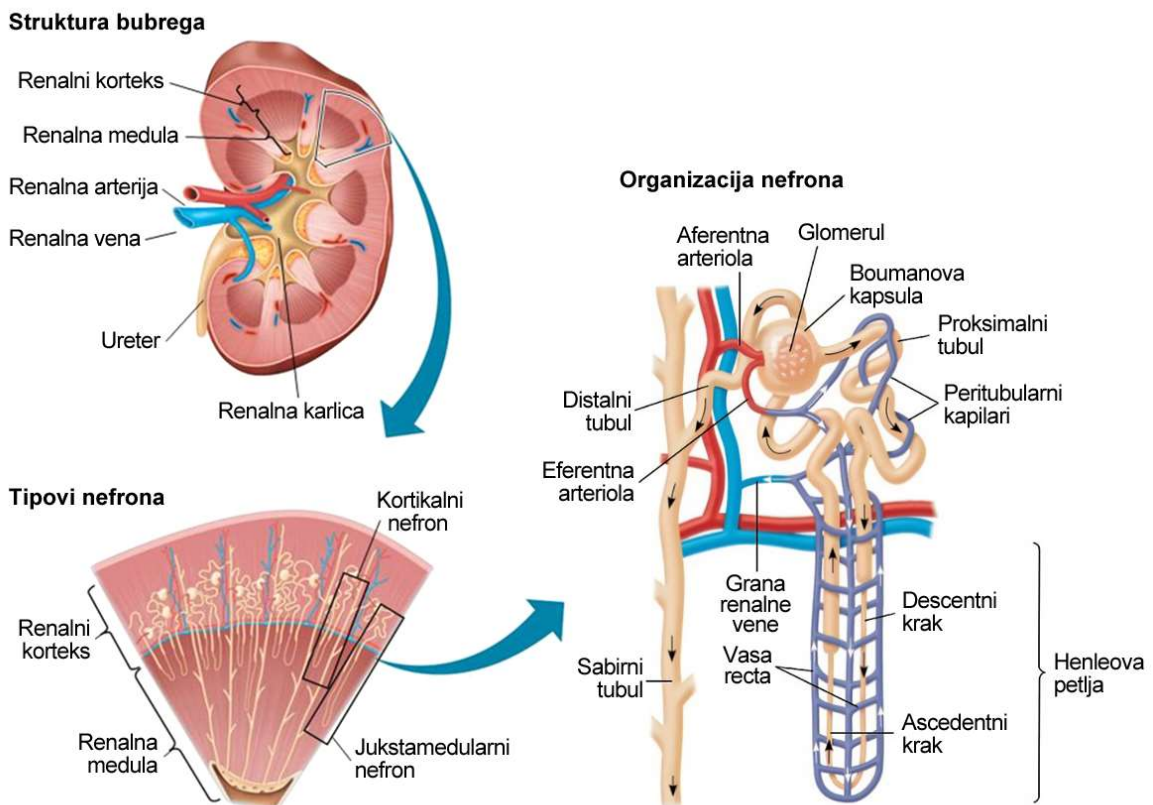
Glomerul je splet od oko pedeset paralelnih kapilara koji se granaju i međusobno anastomoziraju, a pokriveni su epitelnim ćelijama i Boumanovom kapsulom. Pritisak krvi u glomerulu uslovljava filtraciju tečnosti u Boumanovu kapsulu do proksimalnog tubula koji se zajedno sa glomerulom nalazi u korteksu bubrega. Iz proksimalnog tubula tečnost prelazi u Henleovu petlju koja sa svojim tankim silaznim i debljim uzlaznim krakom uranja duboko u bubrežnu medulu. Nakon prolaska kroz Henleovu petlju tečnost prelazi u distalni tubul koji je smešten u korteksu bubrega. U kori bubrega više distalnih tubula se stapaju jedan sa drugim i formiraju sabirni tubul koji prelazi u medulu gde postaje sabirna cev. Više sabirnih cevi se stapaju međusobom, sve vreme leže paralelno sa Henleovom petljom i otvaraju se u bubrežnu karlicu kroz otvore na vrhu bubrežnih papila. Bubrežne papile su nastavci bubrežne medule koje štrče u bubrežne čašice (9).

Razlike u nefronima zavise od toga koliko duboko leže u bubrežnom tkivu. Nefroni čiji su glomeruli smešteni blizu površine bubrega, unutar 3 prečnika prosečnog glomerula od korteksa ($3 \times 60 = 180 \mu\text{m}$) zovu se kortikalni (površinski) nefroni. Čine oko 80% svih nefrona. Tanki segment Henleovih petlji tih nefrona je veoma kratak i prodire samo do spoljašnjeg dela medule.

Nefroni čiji su glomeruli smešteni duboko u bubrežnoj kori i zauzimaju dijametar od 3 prečnika prosečnog glomerula iznad a. arcuatae ($3 \times 60 = 180 \mu\text{m}$) zovu se jukstamedularni nefroni. Tanki

segment Henleovih petlji tih nefrona je veoma dugačak, prodire duboku u unutrašnju zonu medule, a mnogi od njih protežu se sve do vrhova bubrežnih papilla.

Između ove dve grupe položeni su intermedijarni nefroni (10).



Slika 2. Građa nefrona, kortikalni i jukstamedularni nefroni

Preuzeto: 2014 Pearson Education, Inc. Figure 32.19bb Nephron Types Renal cortex Renal medulla Cortical nephron Juxtamedullary nephron.

1.2. INTRAUTERUSNA RESTRIKCIJA RASTA

1.2.1. Definicija intrauterusne restrikcije rasta, fetalni rast i metabolizam

Rast tkiva i organa fetusa, njihova diferencijacija i maturacija zavise od intrauterusnog okruženja, uteroplacentalne funkcije i naslednog genetskog potencijala fetusa. U optimalnim okolnostima fetus u potpunosti dostiže svoj genetski predodređen somatski potencijal i neometano prolazi kroz intrapartalni period, bez komplikacija tokom rane kardiopulmonalne i metaboličke adaptacije na ekstrauterusni život. Međutim, fetalni rast i razvoj se ne odvija uvek pod idealnim intrauterusnim okolnostima (11,12). Neonatusi, koji su tokom trudnoće izloženi aberantnim maternalnim, placentalnim ili fetalnim faktorima koji koče fetalni rast i razvoj, po rođenju pripadaju visokorizičnoj grupi kategorizovanoj kao novorođenčad sa intrauterusnom restrikcijom rasta (intrauterine growth restriction - IUGR).

Intrauterusna restrikcija rasta predstavlja redukciju u očekivanom fetalnom rastu (estimated fetal weigh- EFW) i definisana je kao telesna masa fetusa ispod 10. percentila za gestacijsku starost. Uzrokuju je urođeni smanjeni potencijal fetusa za rast ili multipli procesi koji inhibišu normalan rast fetusa (13).

Fetalni rast se razlikuje u svojoj ranoj i kasnoj fazi. Za vreme embrionalnog i ranog fetalnog rasta prevashodno se umnožava broj ćelija tkiva i organa uz replikaciju DNK u novostvorenom tkivu (tzv. hiperplastična faza ćelijskog rasta). U narednoj fazi fetalnog rasta, uporedo sa povećanjem broja ćelija povećava se i njihova veličina na račun povećanja sadržaja proteina i RNK (tzv. kombinovana hiperplastična i hipertrofična faza) koja u mišićima i mozgu - prvenstveno cerebelumu može da se proteže sve do odojčadskog perioda i detinjstva. Poslednja faza fetalnog rasta je čisto hipertrofična uz dnevni porast u telesnoj masi od 30-35g.

Rast mišića i sinteza proteina fetusa zavise od aktivnog transporta esencijalnih aminokiselina putem placente, a on je ravnomeran tokom čitavog fetalnog života. Na rođenju, mišićna masa predstavlja najveći procenat celokupne telesne mase - 25% (14).

Za razliku od proteina, porast u sadržaju masti najveći je tokom poslednjeg trimestra trudnoće.

IUGR novorođenčad imaju manji procenat masnog tkiva u odnosu na zdravu novorođenčad (17% vs 23%), najviše na račun smanjenja supkutanog i intraabdominalnog masnog tkiva (15).

Insulin i insulinu sličan faktora rasta, tireoidni, adrenalni i pituitarni hormoni ubrzavaju rast i razvoj fetusa, te bilo kakav poremećaj u njihovoj homeostazi može dovesti do IUGR (12,16). Insulin utiče na transport glukoze i aminokiselina preko placente i dovodi do sinteze proteina u mišićima. Ima mitogenu aktivnost koja indukuje rast i proliferaciju ćelija te u slučaju nedostatka fetalnog insulina zbog redukovanog unosa ili slabog iskorišćavanja nutritijenata dolazi do IUGR (12,17). Smanjenje koncentracije fetalnog insulina, koje nastaje kod aplazije pankreasa ili Langerhansovih ostrvaca i tranzitornog neonatalnog dijabetes melitusa, kao i u slučajevima u kojima nedostaju receptori za insulin (Donohue syndrom-Leprechaunism, Rabson-Mendenhall syndrome) ozbiljno ugrožava fetalni rast i ovi pacijenti u adultnoj dobi mogu oboleti od dijabetes melitusa i drugih oboljenja nastalih kao komplikacija hiperglikemije i hiperinsulinemije (18,19). Neadekvatno oslobađanje insulina u pankreasu fetusa i insulinska rezistencija se takođe može javiti u enzimopatijama, kao što je u slučaju mutacije enzima glukokinaze, što takođe dovodi do IUGR-a (12,20).

Insulinu slični faktori rasta 1 i 2 (Insulin like growth factor - IGF1, IGF2) slično insulinu, dovode do proliferacije ćelija i rasta fetusa. Njihovi nivoi su smanjeni kod IUGR, a povišeni kod hipertrofične novorođenčadi. IGF1 ima pozitivan efekat na razvoj oligodendrocita i neurona i njegova oštećenja (delecije, genske varijacije, polimorfizmi) dovode do senzorneuralnih poremećaja i mentalne retardacije sa simetričnim IUGR.

Po istraživanjima nekih autora, fetalni hormoni rasta ne utiču toliko na težinu fetusa koliko na telesnu dužinu. U istim istraživanjima porođajna težina novorođenčadi sa panhipopituitarizmom se nije razlikovala u odnosu na težinu zdrave novorođenčadi, međutim telesna dužina se bitno razlikovala kod zdrave novorođenčadi i one sa nedostatkom receptora za hormone rasta (21,22,23).

Od ostalih fetalnih hormona od velike važnosti je i placentalni hormon rasta (Placental growth hormone - PGH) koji dovodi do povećanog snabdevanja fetusa hranljivim materijama i time bitno utiče na njegov rast i razvoj dovodeći do IUGR u slučaju njegove smanjene koncentracije (24).

U slučaju abnormalne ekspresije uobičajeno inaktivnih gena (Silver-Russell syndrome: uniparentalna dizomija majčinog hromozoma 7) ili pojave tranzitornog neonatalnog dijabetes melitusa (uniparentalna izodizomija 6. hromozoma) dolazi do pojave IUGR (12,25,26). Osim u ovim kompleksnim epigenetičkim mehanizmima postoje i određeni sindromi koji se javljaju u sklopu IUGR kao što je Leprechaunism (Donohue sy) kod koga osim insulinske rezistencije postoji i EGF rezistencija (epidermal growth factor - EGF), zbog abnormalnog EGF receptora. EGF reguliše proces mitoze i razvoj ektodermalnih i mezodermalnih struktura. Smanjena koncentracija EGF receptora je takođe pronađena u posteljici žena koje su pušile tokom trudnoće i rodile IUGR novorođenčad (27).

Detektovanje leptina, koji se primarno sintetizuje u masnom tkivu, u amnionskoj tečnosti i krvi pupčanika novorođenčeta započinje od 29. gestacijske nedelje. Koncentracija leptina u pupčanicu je smanjena kod novorođenčadi sa IUGR, odnosno postoji pozitivna korelacija između koncentracije leptina u pupčanicu i indeksa telesne mase (body mass index - BMI) kao indikatora masnoće u organizmu.

Ponavljano davanje glukokortikoida majci može dovesti do IUGR i ima značajan uticaj na razvoj fetalnih organa (28).

1.2.2. Epidemiologija male telesne mase na rođenju

Termin IUGR i malo za datum (small for gestational age - SGA), iako povezani, nisu sinonimi (29-33). Malo za datum je termin koji definiše novorođenčad čija je težina na rođenju manja od prosečne prema nomogramima za datu populaciju, tj. na desetom ili nižem percentilu. Uzrok je najčešće nepatološki pri čemu su novorođenčad mala, ali zdrava. U tim slučajevima se uglavnom registruje nizak rast majke i oca ili određena etnička pripadnost uz nedostatak bilo kakvih drugih znakova uteroplacentalne insuficijencije (oligoamnion, patološki dopler krvnih sudova i dr.) (34,35).

Nisu sva IUGR novorođenčad i SGA. Porodajna težina novorođenčeta može biti manja od očekivane sa kliničkim znaci malnutricije i zastoja u rastu, iako je prema nomogramima telesne mase za određenu populaciju na ili iznad 50. percentila (12,13,29).

Mala telesna masa (low birth weigh - LBW) je poseban entitet i ne sme se zameniti ni sa IUGR ni sa SGA jer se njena definicija bazira isključivo na telesnoj masi koja je manja od 2500g, bez obzira na gestacijsku starost, pol, rasu i kliničke karakteristike prethodno spomenute za IUGR i SGA (13,36).

IUGR kod terminske novorođenčadi je predominantan uzrok LBW u zemljama u razvoju i skoro dva puta je veći u populaciji crnaca. Familijarna predispozicija male porođajne mase koja uključuje ne samo roditelje već i pretke je od veoma velikog značaja za IUGR. Iako se komplikacije ovakvih trudnoća dešavaju u svim socioekonomskim staležima, problem niske porođajne mase je ipak predominantniji kod žena nižeg socioekonomskog statusa.

1.2.3. Uzroci IUGR

Uzroci intrauterusne restrikcije rasta mogu biti od strane fetusa, majke, placente ili genski.

Svaki od njih vodi neadekvatnoj razmeni gasova i nedovoljnom snabdevanju fetusa kiseonikom i hranljivim nutritijentima (13,36-41).

1.2.3.1. Fetalni uzroci IUGR

- Hromozomske anomalije (trizomije 13,18,21), delecije, uniparentalne dizomije, ring hromozomi
- Genetski sindromi (Bloom syndrome, Russell-Silver syndrome, Cornelia de Lange syndrome, Brachmann–de Lange syndrome, Mulibrey Nanism syndrome, Rubenstein–Taybi syndrome, Dubowitz syndrome, Seckel syndrome, Johanson–Blizzard syndrome, Fanconi syndrome, Roberts syndrome, De Sanctis–Cacchione syndrome)
- Velike kongenitalne anomalije (Traheozofagealna fistula, kongenitalne srčane bolesti, kongenitalna dijafragmatska hernija, omfalocela, gastošiza, defekti neuralne cevi, anorektalne malformacije...)
- Multipla gestacija
- Kongenitalne infekcije (malarija, sifilis, HIV, TORCH infekcije, bakterijske infekcije)
- Metaboličke bolesti (agenezija pankreasa, kongenitalna aplazija Langerhansovih ostrvaca, kongenitalna lipodistrofija, galaktozemija, generalizovana gangliozidoza tip I,

hipofosfatemija, Leprechaunism, fetalna fenilketonurija, tranzitorni neonatalni dijabetes melitus...)

1.2.3.2. Maternalni uzroci IUGR

- Godine majke (manje od 16 i više od 35), loš socioekonomski status
- Rasa i etnička pripadnost (IUGR češći kod crne rase)
- Štetne navike majke (pušenje aktivno ili pasivno, alkoholizam, upotreba narkotika)
- Upotreba štetnih lekova (varfarin, steroidi, antikonvulzivi, antineoplastici, antimetabolici, antagonisti folne kiseline)
- Težak fizički rad
- Težina i visina majke pred začeće (indeks telesne mase manji od 20, težina ispod 45kg i više od 75kg)
- Paritet (nije rađala ili ima više od petoro dece)
- Interval između dve trudnoće manji od 6 meseci ili veći od 120 meseci
- Prethodno dete rođeno sa malom telesnom težinom
- Loša perinatalna zaštita
- Loš socioekonomski status majke
- Hronične bolesti majke (astma, cijanogene srčane mane, hematološka oboljenja, autoimune bolesti, hipertenzija, dijabetes sa vaskulopatijom, hronična bubrežna insuficijencija, tuberkuloza, malarija, urinarne infekcije i bakterijska vaginoza, TORCH infekcije)
- Preeklampsija
- Dugotrajan boravak na nadmorskoj visini preko 2000m dovodi do hipertrofije posteljice u cilju kompenzacije hronične maternalne hipoksije

1.2.3.3. Placentalni uzroci IUGR

- Težina placente ispod 350g
- Abnormalna uteroplacentalna vaskularizacija
- Placentalna disfunkcija usled hipertenzije ili preeklampsije
- Uteroplacentalna patologija uzrokovana trombofilijom, avaskularni vili, arteritis

decidualnih ili spiralnih arterija, multipli infarkti placente, molarna trudnoća, hronične inflamatorne lezije, abrupcija placente, placentalni hemangiomi, placentalne infekcije, multipla gestacija, hronični vilitis, anomalije pupčanika.

1.2.3.4. Genski uzroci IUGR

Placentalni geni:

- Smanjena ekspresija: Placental 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 mRNA, Placental growth factor (PGF), SERPINA3, DLX3, DLX4, MSX2, GAX, ESX1 L, HLX1, Cullin (CUL4B, CUL7), STOX1, Anti-apoptosis Bcl-2, Placental Insulin-like growth factor 1 (IGF1), Epidermal growth factor (EGF).
- Povećana ekspresija: NPAT1 (Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1), Trophoblastic micro RNA (miRNA-424, miRNA-141), Insulin like growth factor binding protein 3(IGFBP3).

Maternalni geni:

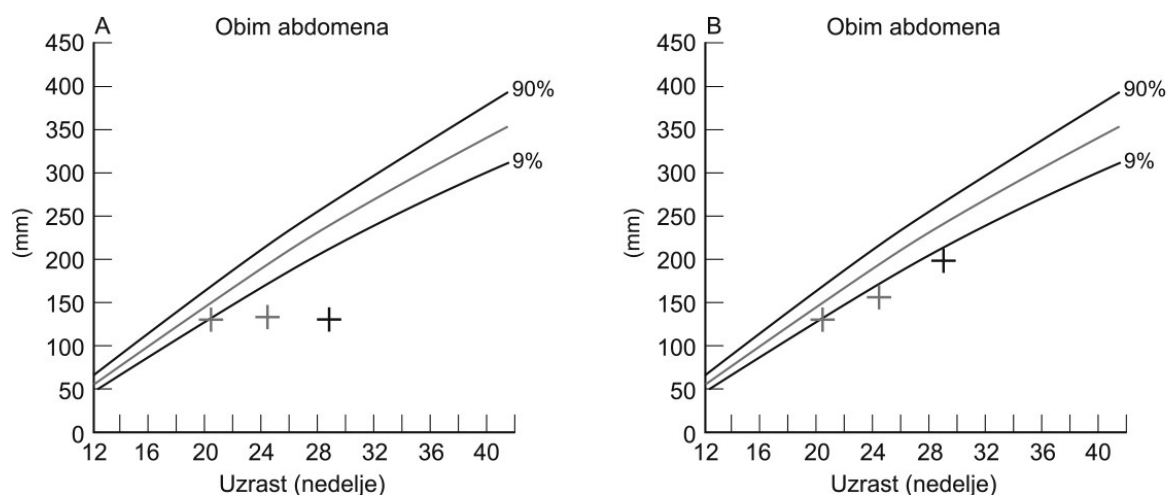
- Smanjena ekspresija leptina i mutacija trombofilija gena.
- Povećana ekspresija: Endothelin-1 (ET-1) gena, Visfatin gena, visoki nivoi Soluble ascular cellular adhesion molecule-1 (sVCaM-1) i Soluble e-selectin (sE-selectin), visoki nivoi u serumu majke i pupčaniku Asymmetric dimethylarginine.

Fetalni geni:

- Visoki urinarni Protein S100B, genetska delecija IGF1 (Insulin Like growth factor 1) i SHOX, mutacija Insulin-like growth factors 1 receptor (IGF-1R) dovodi do smanjenja funkcije IGF-1-receptora, smanjena funkcija N-terminal parathyroid hormone-related protein.

1.2.4. Klasifikacija IUGR

Intrauterusna restrikcija rasta može biti simetrična i asimetrična (42). Kod simetričnih IUGR fetusa u ranom embrionalnom/fetalnom razvoju je došlo do nekog globalnog insulta koji je doveo do restrikcije rasta (napr. genetska ili hromozomska anomalija, fetalni alkoholni sindrom, kongenitalne virusne infekcije - TORCH). Ova novorođenčad imaju podjednako smanjen obim glave, abdomena i dužinu tela. Za razliku od njih, fetusi sa asimetričnom intrauterusnom restrikcijom rasta su mali uglavnom zbog uteroplacentalne insuficijencije, malnutricije majke u poslednjem trimestru ili zbog delovanja nekog drugog spoljašnjeg faktora u kasnoj trudnoći: imaju normalan obim glave i dužinu tela, a smanjen obim abdomena na račun veličine jetre (13).



Slika 3. Obim abdomena po gestacijskim nedeljama kod A) IUGR novorođenčadi i B) SGA novorođenčadi (47)

U ovim slučajevima se javlja preraspodela fetalne cirkulacije prema vitalnim organima srcu i mozgu. Na rođenju ova novorođenčad imaju normalan obim glave, smanjen obim abdomena, mršave ekstremitete zbog smanjenja mišićne mase i istanjenu kožu zbog neadekvatno razvijenog masnog tkiva.

U slučaju prolongirane uteroplacentalne disfunkcije kod ovih fetusa dolazi do smanjenja srčanog izbačaja i za vreme atrijalne kontrakcije javlja se reverzni protok u dijastoli kroz duktus

venozus. Umbilikalni arterijski pulsatilni indeks veći od 2SD (standardne devijacije) sa velikom sigurnošću ukazuje na IUGR (43).

U slučaju postojanja mešovite intrauterusne restrikcije rasta ćelije su male i po broju i po veličini. Ovi neonatusi na rođenju imaju kliničke karakteristike podjednako simetričnog i asimetričnog IUGR. Nastaje kada je rani IUGR u poslednjem trimestru pogođen i placentalnom disfunkcijom (42).

1.2.5. Dijagnoza IUGR

Jedan od najčešćih uzroka mrtvorodenja je IUGR (44).

Živorodena IUGR novorođenčad imaju konsekvence koje mogu biti akutne, najvećim delom zbog prevremenog rođenja i njegove široke patologije kao i dugoročne koje se prvenstveno odražavaju na rast i intelektualni razvoj pri polasku u školu i u mladosti. Fundamentalnu ulogu u dijagnozi i traženju uzroka IUGR imaju ginekolozi-perinatolozi, sve u cilju izbegavanja njegovih kratkoročnih i dugoročnih sekvela (45). Cilj antenatalnog monitoringa je rana detekcija IUGR radi optimizacije neonatalnog ishoda.

Nekada se u opštoj populaciji skrining intrauterusne restrikcije rasta zasnivao na rutinskom merenju razdaljine od simfize do fundusa uterusa sa kojim se započinjalo od 20.gn do termina porođaja. Razlika veća od tri cm u odnosu na očekivanu, zahtevala je dalju ultrazvučnu kontrolu i ostale metode za dijagnostiku IUGR. Zbog loše predikcije ova metoda je uglavnom napuštena (46,47).

U većini slučajeva procenjena telesna masa ispod 10. percentila ukazuje na fetuse koji su u riziku za IUGR. Međutim, to nije uvek granica za uteroplacentalnu insuficijenciju. Određen broj fetusa koji su ispod 10. percentila su konstitucionalno mali, bez bilo kakvih drugih znakova uteroplacentalne insuficijencije. Tada uvek treba uzeti u obzir telesnu visinu majke, oca, predaka i koristiti odgovarajuće nomograme za etničku pripadnost, rasu i pol (34).

U cilju dijagnostike IUGR najčešće se meri biparijetalni dijametar, obim glave, obim abdomena i dužina femura nakon čega se dobijene mere uvrste u postojeće percentilne grafikone. Od koristi

je i određivanje odnosa obim glave/obim abdomena koji se smanjuje sa 1,2 na 1,0 od 20. do 36. gn. Povećan odnos, preko 2 standardne devijacije se nalazi kod fetusa sa asimetričnim IUGR koji na rođenju imaju mali indeks telesne mase (48,49).

Smanjena količina plodove vode - oligoamnion se javlja usled smanjenja renalne perfuzije i diureze fetusa, u cilju redistribucije krvotoka prema srcu i mozgu. Kod oko 85% IUGR fetusa se dijagnostikuje oligoamnion. Indeks amniotske tečnosti (Amniotic fluid index -AFI) ispod 5cm i vertikalni džep amniotske tečnosti koji je manji od 1cm, bez obzira na gestaciju, tesno koreliraju sa IUGR (50,51,52).

Dopler krvnih sudova se koristi za dijagnozu i praćenje IUGR fetusa. Dopler a. uterine nam ukazuje na stanje majčine cirkulacije, dok najčešće korišćeni dopler arterije umbilikalis i arterije cerebri medije nam ukazuju na stanje fetalne cirkulacije tj. kompenzatornu vazodilataciju krvnih sudova mozga kao odgovor na hipoksiju fetusa. Od ostalih dopler ispitivanja koristi se cerebroplacentalni dopler, dopler istmusa aorte i veoma važan dopler duktusa venosusa, pri čemu odsutan ili reverzan protok kroz duktus venosus se javlja u najtežim slučajevima IUGR (52,53).

Oksitocin test se koristi da bi se predvidela iznenadna smrt hipoksičnih fetusa. Deset minuta nakon intravenskog ubrizgavanja oksitocina se javljaju uterine kontrakcije. Ako se posle tri uterine kontrakcije jave i tri kasne deceleracije smatra se da je oksitocin test pozitivan i da je uteroplacentalna cirkulacija kompromitovana. Izvođenje testa zahteva boravak u bolnici i postoje kontraindikacije za njegovo izvođenje (prethodni carski rez, placenta previja, moguća indukcija prevremenog porođaja) te ovaj test nije postao standard za dijagnozu IUGR. Umesto njega češće se koriste non-stres test i određivanje biofizičkog profila ploda.

Non-stres test je jedan od najstarijih testova za praćenje IUGR fetusa. Kardiotokografom se beleže promene u srčanim otkucajima ploda za vreme kontrakcija uterusa i spontaninih pokreta ploda. Test je reaktivan ako se broj srčanih otkucaja ploda poveća za više od 15 u minuti ili je nereaktivan. Novija istraživanja ukazuju da ne postoje sigurni podaci da rutinska primena non-stres testa poboljšava perinatalni ishod kod rizične novorođenčadi (54).

Određivanje biofizičkog profila ploda odražava acido-bazni status fetusa i koristi se za dijagnozu IUGR i praćenje kondicije IUGR fetusa. Kombinuje non-stres test sa četiri ultrazvučna parametra (AFI, fetalni pokreti, disanje i mišićni tonus). Ako je ukupni skor manji od šest, to

ukazuje na mogućnost lošeg ishoda po novorođenče. Mana testa je što abnormalan skor ukazuje na već postojeću ozbiljnu hipoksiju fetusa. *Cochrane* meta analizom je ustanovljeno da ne postoji dovoljno podataka iz različitih randomiziranih kontrolisanih studija koje bi podržale korišćenje biofizičkog profila ploda kao standarda za praćenje kondicije fetusa u visokorizičnim trudnoćama (55).

1.2.6. Ishod IUGR

IUGR predstavlja izazov za kliničare jer se najvećim delom događa u trudnoćama bez ikakvih riziko faktora. Jednom kada se IUGR detektuje, vođenje trudnoće i odluka o terminaciji iste treba da se zasniva na maksimalizaciji gestacijske starosti uz minimalizaciju neonatalnog morbiditeta i mortaliteta. Trudnice kod kojih se IUGR dijagnostikuje između 24. i 34. gn treba da prime kortikosteroidnu terapiju u cilju poboljšanja maturacije pluća fetusa (36).

Upotreba sildenafil-citrata (Viagra) u cilju poboljšanja fetoplacentalne perfuzije posredstvom relaksacije zidova krvnih sudova uterusa može biti potencijalna terapijska strategija u trudnoćama sa intrauterusnom restrikcijom rasta (56).

U nekoliko studija je sprovedeno ispitivanje o uticaju L-arginina na ubrzanje rasta IUGR fetusa sa pozitivnim rezultatima u smislu produženja gestacijske starosti i povećanja telesne mase (57).

Hronična *in utero* asfiksija fetusa dovodi do hipoksičnog cerebrovaskularnog insulta koji udružen sa hipoksijom svih ostalih organa i organskih sistema povećava morbiditet i mortalitet ove novorođenčadi. Kada se izuzme grupa novorođenčadi kod koje je IUGR izazvan kongenitalnom infekcijom ili hromozomskim anomalijama, kod najvećeg preostalog dela IUGR novorođenčadi, intelektualni i neurološki razvoj zavise od komorbiditeta, tj. od samog uzroka IUGR. Test inteligencije sproveden u uzrastu od dve i pet godina i adolescenciji je ukazao na moguću pojavu kognitivne disfunkcije kod dece koja su rođena kao IUGR, u vidu smanjene sposobnosti za obavljanje školskih aktivnosti zbog poremećaje pažnje, percepcije i teškoća pri učenju (58-60).

Odrasle osobe koje su na rođenju bile IUGR uglavnom imaju normalan IQ, dobro su uklopljene i socijalno zadovoljne životom, iako znatno ređe postižu visoke profesionalne sposobnosti (61).

Postnatalni rast IUGR novorođenčadi zavisi od uzroka IUGR, ishrane i okruženja. Deca kod koje je uzrok IUGR kongenitalna infekcija ili hromozomopatija ostaju niska tokom celog života. Novorođenčad kod koje uzrok nastanka IUGR leži u placentalnoj disfunkciji u 90% slučajeva dostižu adekvatan rast u drugoj godini života, pogotovo ako su imala normalnu telesnu dužinu na rođenju (62).

Što je manja gestacijska starost i porođajna težina, to je manja šansa da novorođenče dostigne svoju idealnu telesnu visinu. Terapija hormonima rasta može dovesti do ubrzanja rasta pretermijske IUGR novorođenčadi koja nisu dostigla svoj maksimalni potencijal za rast do kraja druge godine života (63). Potrebne su dalje studije koje bi mogle rasvetliti strategiju prevencije i lečenja IUGR.

1.2.7. Fetalno poreklo bolesti odraslog doba

Na vezu između okruženja u kome se razvija fetus tokom trudnoće i pojave bolesti u kasnijem životu je prvi put ukazao profesor Dejvid Barker (*David Barker*), poreklom Englez, koji je sredinom osamdesetih godina doveo u vezu povećan broj metaboličkih bolesti potomaka pothranjenih trudnica iz II svetskog rata, koji su rođeni tokom holandske "gladne zime" 1944-1945. godine. Takođe, ukazao je na činjenicu da određene regije u Engleskoj, koje su početkom XX veka imale najveću stopu smrtnosti novorođenčadi usled male porođajne mase, decenijama kasnije su imale i najveći broj kardiovaskularnih bolesti među stanovništvom srednjih godina.

Ova hipoteza koja se zasniva na pretpostavci da najveći broj novorođenčadi sa malom porođajnom težinom, koja prežive novorođenčaki i odojčadski period, u kasnijem životu razvijaju metabolički sindrom (hipertenzija, gojaznost, insulinska rezistencija i dijabetes tip 2) zove se Barkerova hipoteza ili fetalno poreklo bolesti odraslog doba (*Fetal Origin of Adult Disease*), a aktuelni termin je razvojno poreklo bolesti i zdravlja (*Developmental Origins of Health and Disease - DOHaD*) (36,64,65).

IUGR nastaje kao posledica pothranjenosti trudnice, placentalne disfunkcije i smanjene fetalne oksigenacije. Fenomen ispoljavanja metaboličkog sindroma u adultnoj dobi kod ove

novorođenčadi se generalno zasniva na tome da je pothranjeni fetus programiran da ispolji tzv. "štedljivi fenotip" sa smanjenim kalorijskim unosom i smanjenom proizvodnjom energije. U slučaju postojanja veće količine raspoloživih kalorija dolazi do razvoja gojaznosti i metaboličkog sindroma zbog izmena u programiranoj homeostazi. Pridružene bolesti su posledica razvojnog plasticiteta, fenomena u kome jedan genotip može stvoriti različite fenotipove kao odgovor na uslove sredine tokom fetalnog rasta i razvoja (66).

Radi pripreme za postnatalni život, pretpostavlja se da kod fetusa dolazi do fizioloških adaptacija kao odgovor na promene u sredini. Ove promene mogu da uključe epigenetske modifikacije genske ekspresije. Trenutno nije rasvetljeno kakav je uticaj fenomena fetalnog programiranja na blizance i prevremeno rođenu novorođenčad, kao ni da li su ovi efekti reverzibilni. Trenutna istraživanja u ovoj oblasti imajuće direktne implikacije za budućnost opstetričke prakse (67).

Tri različite hipoteze su predložene u cilju objašnjenja ove veze:

1.2.7.1. Hipoteza fetalnog insulina (*Fetal insulin hypothesis*) i kasni dijabetes genski kodiran u mladosti (*Mature onset diabetes of the young gene - MODY2*)

Hipoteza podržava vezu između gena koji dovodi do insulinske rezistencije tokom trudnoće, IUGR i povećanog rizika za dijabetes tip 2. Kao ishod insulinske rezistencije, IUGR potomstvo će imati abnormalan razvoj krvnih sudova u fetalnom životu i mladosti što dovodi do hipertenzije i vaskularnih oboljenja. Dokaz za to su osobe koje imaju dijabetes tip 2 nastao kao rezultat mutacije gena glukokinaze koja dovodi do smanjenja insulinske sekrecije i na kraju *MODY2* (68).

1.2.7.2. Štedljivi genotip (*Thrifty genotype*)

Ovu hipotezu je predložio Nil (Neel) još davne 1962. koji je smatrao da geni koji su odgovorni za pojavu dijabetesa u bilo kojoj životnoj dobi su kodirani u genomu svih pojedinaca i odgovorni su za skladištenje masti u slučaju nedovoljnog kalorijskog unosa i izgladnjivanja. U slučaju intrauterusnog okruženja sa limitiranom ishranom i nedovoljnim snabdevanjem kiseonikom, ekspresija ovih gena postnatalno se dovodi u vezu sa sve učestalijom i ranijom pojavom gojaznosti kada postoji povećan kalorijski unos i manjak fizičke aktivnosti (69).

1.2.7.3. Štedljivi fenotip - Barkerova hipoteza

Ovo je najprihvatljivija hipoteza koja objašnjava razvojno poreklo bolesti. Zasniva se na činjenici da okruženje u kome se fetus nalazi u toku svog razvoja ima dugoročne sekvele na njegov kasniji život. Na ovoj hipotezi se zasniva veza između IUGR i razvojnog porekla bolesti.

U slučaju pojave IUGR zbog postojanja nepovoljnih faktora bilo koje etiologije, za normalan rast i razvoj fetus se in utero adaptira na ovo „neprijateljsko“ okruženje redistribucijom krvotoka prema mozgu i srcu, smanjenjem produkcije i senzitivnosti na fetalni insulin i IGF1 i regulisanjem hipotalamusno-hipofizno-adrenalne osovine. Ovo metaboličko programiranje (tj. epigenetska modifikacija onih molekularnih mehanizama koji utiču na genske modele bez poremećaja u DNK sekvenci) se dešava u kritičnom momentu fetalnog razvoja (najčešće u periodima deobe ćelija) i zbog toga ove epigenetske promene postaju permanentno programirane u genima fetusa. Kada se ovim antenatalnim epigenetskim promenama postnatalno doda neadekvatna ishrana (višak kalorijskog unosa) ili suboptimalno okruženje (sedanterni način života, manjak fizičke aktivnosti...) dolazi do ubrzanog razvoja *DoHaD* (70).

Ove epigenetske promene mogu biti rezultat hemijskih ili nutritivnih poremećaja tokom razvoja ili prenatalnog stresa. Dovode do izmenjene genske ekspresije koja vodi promeni u strukturi ćelijskih proteina i promena u broju i mestu ćelija. Animalni model LBW koga prati ubrzani postnatalni rast je ukazao na povećan oksidativni stres, skraćenje telomere i ubrzano starenje bubrega, srca, aorte, čak i letalnog ishoda u neonatalnom periodu (71,72).

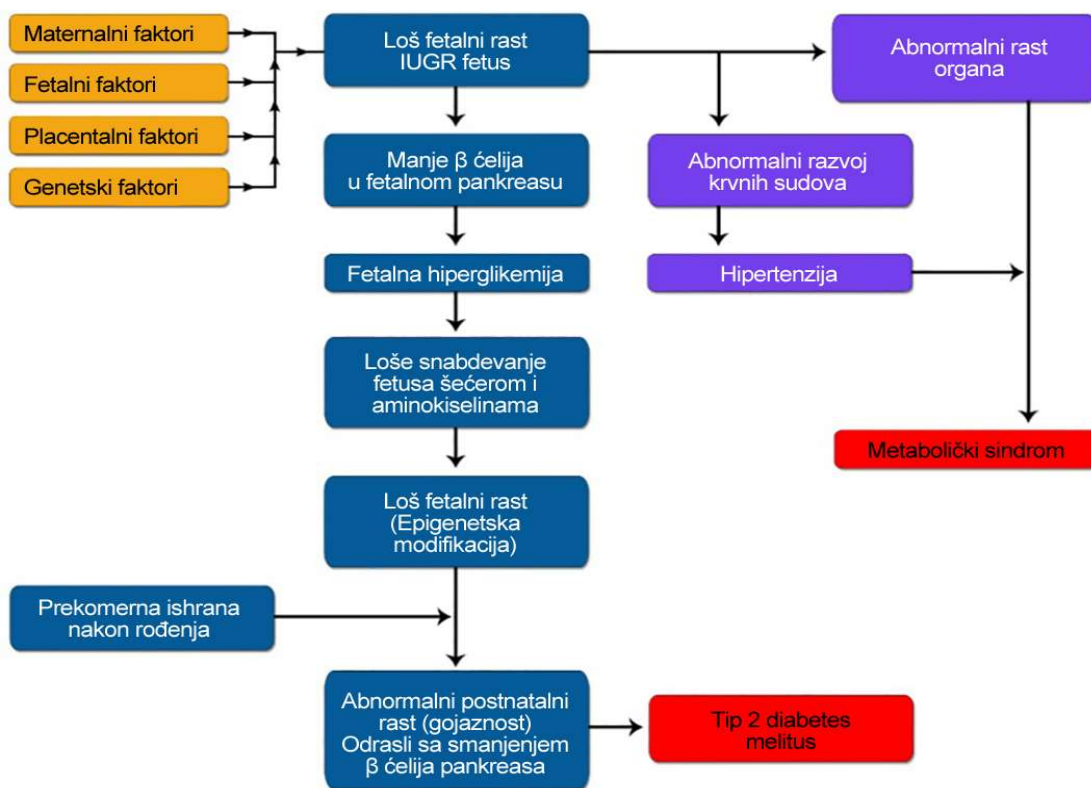
Novije studije se osim na pojavu metaboličkih, koncentrišu i na pojavu imunoloških, reproduktivnih i mentalnih bolesti (73).

Varijante *DoHaD* koje se dijagnostikuju kod IUGR neonatusa u odrasloj dobi su: hipertenzija, ishemijska bolest srca, dijabetes melitus tip 2, bubrežne bolesti, bolesti jetre, hiperholesterolemija, gojaznost, reaktivne bolesti disajnih puteva, karcinomi, šizofrenija, Parkinsonova bolest, Alchajmerova bolest, policistični ovarijalni sindrom, depresija, anksioznost, bipolarni poremećaji, imunodeficijencije, osteoporoza, socijalni problemi, smanjene kognitivne funkcije (74).

Potrebno je bolje informisanje celokupnog društva o globalnim zdravstvenim naporima

usmerenim ka rešavanju sve veće epidemije hroničnih oboljenja koja vode poreklo od *in-utero* okruženja. Usvajanje principa da je *DoHaD* odgovoran za pojavu bolesti, ne samo tokom čitavog života jedinke, nego i tokom nekoliko generacija, može promovisati integrativniji pristup razumevanju poremećaja u razvojnom programiranju, u cilju boljih kliničkih intervencija (75).

Prevenција bolesti i njeno otkrivanje na samom početku je najbolje ulaganje u zdravlje i razvoj dece i osnova za poboljšanje zdravstvenog, socijalnog i ekonomskog razvitka društva (76).



Slika 4. Barkerova hipoteza razvojnog porekla bolesti (štedljivi fenotip)

Preuzeto: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4946587/figure/f9-cmped-10-2016-067/?report=objectonly>

1.2.8. Brennerova hipoteza – teorija hiperfiltracije

Krajem osamdesetih godina Brener (*BM Brenner*) i saradnici su ustanovili da smanjen broj glomerula bubrega, bilo koje etiologije, dovodi do smanjenja ukupne filtracione površine glomerula. U ovakvom stanju dotok krvi u glomerule je povećan u pokušaju da se održi normalna stopa glomerularne filtracije. To dovodi do hiperfiltracije koja predisponira razvoju glomerularne hipertenzije i hipertrofije, vodi ka sistemske hipertenziji sa povećanom reapsorpcijom natrijuma, albuminurijom i na kraju glomerulosklerozom koja još više smanjuje filtracionu površinu glomerula (77-82). Kod ljudi broj nefrona široko varira od 200.000 do 2,5 miliona po jednom bubregu (83). Nema stvaranja novih nefrona nakon rođenja, a do redukcije njihovog broja uobičajeno dolazi posle četrdesete godine kao posledica procesa starenja. Pojedinci koji se nalaze u grupi sa urođeno manjim brojem nefrona su u kasnijem životu podložniji razvoju esencijalne hipertenzije u odnosu na ostale.

Hajman i saradnici su u svojoj studiji zabeležili povišen krvni pritisak preko 150mmHg kod pojedinaca sa manje od 700.000 glomerula po bubregu, što je ove autore navelo na zaključak da u slučaju smanjenog broja nefrona, ispod 30% od normalnih vrednosti dolazi do razvoja sistemske hipertenzije. Kao uzrok iste se najčešće navodi smanjenje glomerularne filtracione površine.

Dijametar glomerula je indirektna mera glomerularne filtracione površine i varira u novorođenačkom uzrastu do postepenog dostizanja uobičajenog dijametra od 60 μ m (84,85).

Kao što je navedeno broj glomerula kod ljudi je determinisan do 36. gn i ne povećava se u neonatalnom periodu (86). Izuzetak su nezrela nedonoščad kod kojih se abnormalna nefrogeneza odvija do 40. postnatalnog dana života sa razvojem imaturnih, aberantnih glomerula i uključivanjem kompenzatornih mehanizama u vidu glomerularne hipertrofije i mezangijalne proliferacije koje vode ka hiperfiltraciji (87). Aberantni glomeruli su površinski, pokazuju cističnu morfologiju sa grubo proširenim Boumanovim prostorom, atubularni i samim tim afunkcionalni (88). Ultrazvučnim pregledima bubrega LBW novorođenčadi ustanovljeno je da imaju tanje bubrege normalne dužine što sugerise postojanje manjeg broja nefrona (89).

Studije su potvrdile direktnu vezu između telesne mase na rođenju i broja nefrona. Sa svakim kilogramom više broj nefrona je povećan za 250.000 po jednom bubregu (86).

Nakon rođenja, od detinjstva do adultne dobi u skladu sa povećanim funkcionalnim zahtevima bubrega i povećanim bubrežnim protokom povećava se i veličina glomerula. Preterano povećanje volumena glomerula u odnosu na ukupan broj nefrona, rasu, godine života i veličinu tela predstavlja strukturnu komponentu glomerularne hipertenzije koja može dovesti do glomeruloskleroze i gubitka funkcije bubrega (90).

U radu *Okabayashija* sugerisano je da je volumen glomerula heterogen kod adultnih Japanaca, a do takvih promena dolazi zbog različitih stečenih procesa tokom perioda odrastanja. Osetljivost glomerula na hemodinamske promene u različitim delovima korteksa bubrega može varirati između osoba, a gojaznost je faktor rizika za razvoj hroničnog oboljenja bubrega uz prvo predominantno povećanje volumena glomerula u površinskoj zoni korteksa, a napredovanjem glomeruloskleroze povećava se i volumen jukstamedularnih glomerula (91).

1.2.9. Kliničke konsekvence oštećenog razvojnog programiranja bubrega

Embriološki razvoj bubrega je čvrsto kontrolisan i *in vitro* studije su ukazale da bilo kakva manipulacija za vreme glomerularne morfogeneze može dovesti do smanjenog broja nefrona (92).

U *in vivo* studijama, restrikcija proteinskog unosa tokom trudnoće kod ženki pacova je dovela do redukovanog broja glomerula (93). Ovako nasleđen smanjeni broj glomerula u slučaju bilo kakvog hemodinamskog tereta dovodi do oštećenja renalne funkcije. Mnoge studije su ispitivale događaje i promene tokom trudnoće koje su vodile ka smanjenom broju nefrona postnatalno: hipoproteinska dijeta majke, ishrana siromašna gvožđem i vitaminom A, ligatura a. uterine, hiperglikemija majke, prenatalno izlaganje majke glukokortikoidima, antibioticima i etanolu. (94,95). Zajednički imenilac za sve ove događaje je IUGR potomstvo sa malom porođajnom masom, smanjenim brojem nefrona i većim volumenom nefrona što vremenom vodi ka hipertrofiji i hiperfiltraciji nefrona (87,96).

Srednji volumen glomerula kod pacova koji su unilateralno nefrektomirani u neonatalnom uzrastu je bio za 59% veći u odnosu na prosečan, a kod pacova koji su nefrektomirani u adultnoj dobi za 20% što sugeriše na veći stepen kompenzatorne hipertrofije i hiperfunkcije kada se nefrektomija dogodi u neonatalnoj dobi. Prema teoriji hiperfiltracije ona vremenom dovodi do povećane reapsorpcije natrijuma, povećanja krvnog pritiska, albuminurije, glomeruloskleroze i bubrežne insuficijencije (77). Na obdukcijama sredovečnih osoba (35-59 godina) koje su akcidentalno izgubile život u nesrećama, a imale su istoriju hipertenzivne bolesti ili hipertrofiju leve komore, potvrđeno je da je broj njihovih nefrona redukovan uz veći volumen glomerula, što je bilo objašnjenje za njihovu primarnu hipertenziju (97).

Keijzer-Veen i kolege su 2005. god. utvrdili pozitivnu korelaciju između porođajne težine i stope glomerularne filtracije i negativnu korelaciju između porođajne težine i serumskog kreatinina, sugerišući da su IUGR osobe u većem riziku za razvoj hipertenzije i progresivne renalne insuficijencije. U istoj studiji su ispitivani devetnaestogodišnjaci koji su rođeni pre 32.gn. Što je porođajna težina bila manja i stopa glomerularne filtracije je bila niža, vrednosti serumskog kreatinina više uz mikroalbuminuriju, bez obzira na telesnu težinu u trenutku ispitivanja (98).

Bubrezi preterminske novorođenčadi su manji u odnosu na terminsku, a pošto se nefrogeneza završava sa 36gn, prevremeno rođena novorođenčad imaju znatno manji broj glomerula u odnosu na terminsku. U kombinaciji prematuriteta i IUGR, koji često idu udruženo, povećava se i rizik za nastanak progresivnog renalnog oštećenja (87). Dalja ispitivanja su potrebna jer su podaci o bubrežnoj funkciji odraslih osoba koje su rođene pre vremena oskudni.

U drugim eksperimentalnim modelima je utvrđeno da smanjen broj nefrona na rođenju ne mora uvek dovesti do povišenog krvnog pritiska tokom života. Međutim, u slučaju smanjenja funkcionalne rezerve nefrona (unilateralna nefrektomija, povrede bubrega...) glomeruli dolaze do granice fiziološke kompenzatorne hipertrofije i pokreću se patološki mehanizmi koji mogu usloviti razvoj hipertenzije. Prolongirana hiperfiltracija hipertrofičnih glomerula uzrokuje njihovu sklerozu i eventualni gubitak. Povećan glomerularni pritisak je najvažniji akter i pokretač svih naknadnih patoloških procesa. Povećanom intrarenalnom pritisku doprinosi i

renin-angiotenzin-aldosteron sistem. Povišeni pritisak utiče na mezangijalni deo dovodeći do povećanja broja ćelija i volumena. Štetne interakcije između visokog pritiska, povećanog kapilarnog volumena i relativno fiksiranog broja podocita doprinose razvoju sklerotičnog procesa. Promene u strukturi endotelnih ćelija se dešavaju kao direktan odgovor na ove hemodinamske promene, ali njihova uloga u nastanku glomerularne skleroze nije toliko jasna kao uloga mezangijalnih i glomerularnih epitelnih ćelija (99).

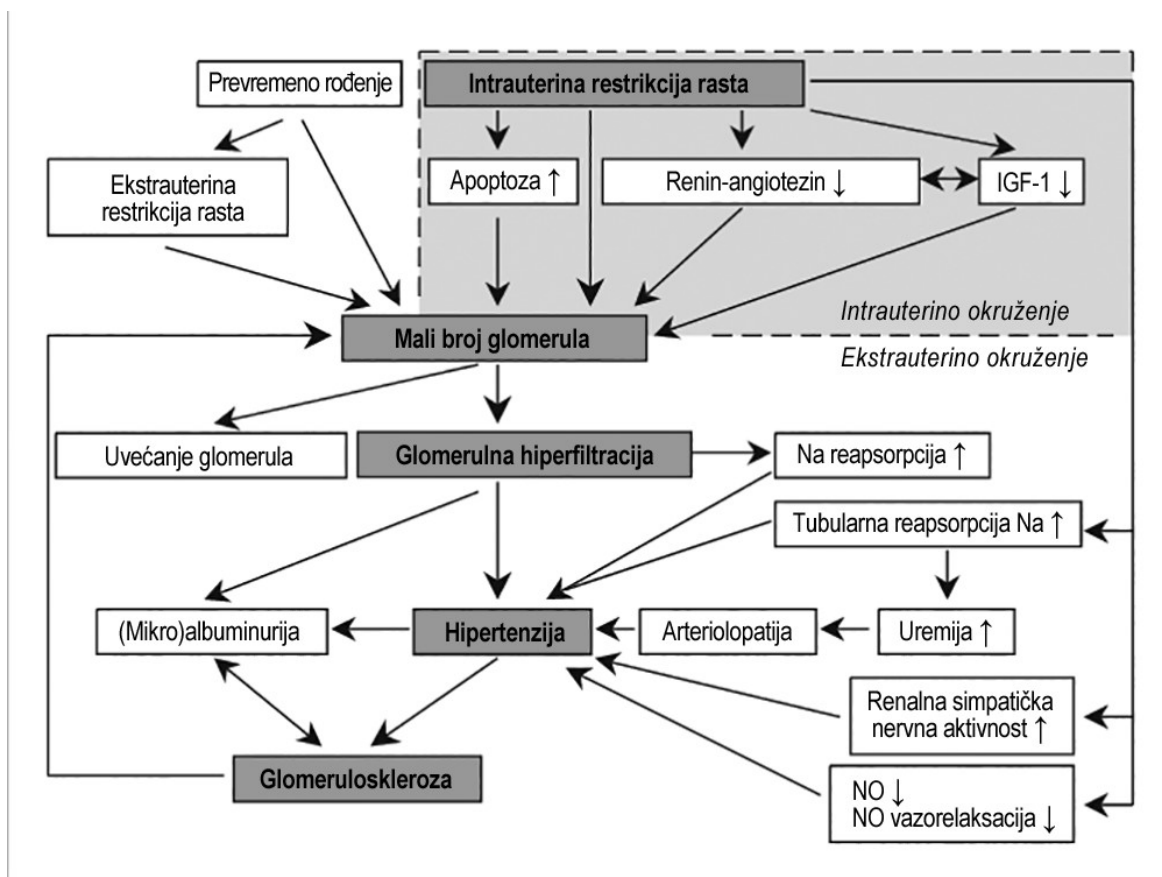
Dobro je poznato da intrarenalni renin-angiotenzin sistem (RAS) igra važnu ulogu za normalan morfološki razvoj bubrega i sve komponente RAS se mogu naći i kod životinja i kod ljudi u ranoj gestaciji, u mezo i metanefrosu. Neke studije su ukazale da nivo renalne renin i angiotenzin II informacione RNK je signifikantno snižen kod novorođenčadi koja su *in utero* bila izložena niskom proteinskom kalorijskom unosu, što sugerise da bi malnutricija majke mogla uticati na supresiju novorođenačkog intrarenalnog RAS, samim tim i na nefrogenezu što bi rezultiralo smanjenjem broja nefrona (100-103). Povišena aktivnost RAS bi mogala biti kompenzatorni mehanizam kod smanjenog broja nefrona u cilju održavanja normalne filtracije (104). Inhibicija RAS *in utero* igra jednu od uloga u nastanku smanjenog broja nefrona kod IUGR modela. Korišćenje ACE inhibitora tokom drugog i trećeg trimestra trudnoće je fetotoksično i dovodi do fetalne hipotenzije, renalne tubularne displazije i anurije sa oligohidramnionom, najverovatnije zbog redukcije u ekspresiji esencijalnih faktora rasta (105,106). Postoji veza između RAS i IGF1. Davanje ACE inhibitora mladuncima pacova povećava ekspresiju vezujućeg proteina za insulinu sličan faktor rasta 1(IGFBP1) i smanjuje količinu cirkulišućeg IGF1. Naknadno davanje IGF1 u vidu infuzije uz ACE inhibitor ponovo normalizuje histološki nalaz bubrega (107). Na modelima bubrega glodara ustanovljeno je da IGF1 igra važnu ulogu u metanefričkoj morfogenezi pri čemu njegova smanjena koncentracija dovodi do rane glomeruloskleroze (108). Neke eksperimentalne studije podržavaju hipotezu da je fetalno programiranje povezano sa regulacijom transporta natrijuma (109). Opisano je odsustvo Na⁺/K⁺ ATP-aze kod IUGR mladunaca tokom ranog postnatalnog života, zbog čega dolazi do zadržavanja soli i vode i proširenja intravaskularnog kompartmenta (110). Studije na životinjskim modelima su pokazale da disregulacija hormona angiotenzin II kod IUGR potomstva snažno utiče na inhibiciju Na⁺/K⁺ ATP-aze, time objašnjavajući mali procenat ekskrecije natrijuma i njegovu retenciju u organizmu (110).

Uloga azot-oksida (NO) je važna tokom razvoja bubrega zato što *in utero* on održava nisku vaskularnu rezistenciju u uteroplacentalnoj cirkulaciji (112). Njegov deficit usled delovanja antagonista (napr. analozi arginina) vodi razvoju hipertenzije. Hronična blokada NO kod pacova tokom dva meseca je dovela do značajne renalne vazokonstrikcije sa povećanjem glomerularnog krvnog pritiska, redukcijom glomerularnog kapilarnog ultrafiltracionog koeficijenta, proteinurijom i na kraju glomerularnom sklerozom. Ova zapažanja su rasvetlila važnost endogenog NO i mogućnost razvoja hipertenzije u slučaju njegovog deficita (113).

Mokraćna kiselina smanjuje proizvodnju NO. Studija na životinjskom modelu pacova sa umerenom hiperurikemijom je rezultirala preglomerularnom arteriolopatijom koja zbog zadebljanja zidova krvnih sudova dovodi do hipoperfuzije bubrega, ishemije, tubulointersticijalne inflamacije, fibroze i izaziva glomerularnu hipertenziju (114).

U nekim studijama se spominje bitnost perfektnog balansa između ćelijske proliferacije i apoptoze za vreme nefrogenze jer bilo kakva disregulacija može dovesti do greške u fetalnom programiranju: promene u ćelijskoj proliferaciji, apoptozi i narušenoj nefrogenezi (115). Dugoročni uticaj IUGR i male porođajne mase se dovodi u vezu i sa sa glomerulskim bolestima bubrega u detinjstvu i odraslom dobu: idiopatska membranozna nefropatija, IgA nefropatija, nefrotski sindrom minimalnih promena, dijabetična nefropatija (116-118).

Konsekvence IUGR i LBW se ne odnose samo na broj nefrona, već i na veličinu glomerula, transport Na i vaskularnu reaktivnost. Svake godine, širom sveta se rodi po nekoliko miliona beba sa malom telesnom masom, a hipertenzija i bubrežne bolesti su u porastu do epidemioloških razmera. Trenutno, vrlo malo se može učiniti u cilju povećanja broja nefrona, te adekvatna prenatalna zaštita, umerena i balansirana ishrana i fizička aktivnost su ključne za očuvanje broja nefrona svakog pojedinca i sprečavanje razvoja bolesti (119).



Slika 5. Potencijalni mehanizmi koji dovode do malog broja glomerula i hipertenzije (120)

Preuzeto: https://www.researchgate.net/figure/Potential-mechanisms-leading-to-low-glomerular-number-and-subsequent-hypertension_fig1_6947464

1.3. ANIMALNI MODELI FETALNE RESTRIKCIJE RASTA

1.3.1. Zašto se koriste animalni modeli

Razvoj trofoblasta, placentacija i placentalni transport se mogu proučavati *in vitro*, ali veoma kratko vreme. Kultivisanjem trofoblasta iz placente nakon porođaja omogućava se proučavanje ćelija placente, hemodinamika kao i transfer lekova kroz istu, ali kratkotrajno, nekoliko časova, pre nego što dođe do narušavanja integriteta placentalne barijere (121,122). Iako postoje prednosti u korišćenju *in vitro* modela za proučavanje određenih patoloških stanja tokom

trudnoće, proučavanje patologije intrauterusne restrikcije rasta se mora raditi na *in vivo* modelima životinja jer za sada ne postoje *in vitro* modeli koji bi podržali takva ispitivanja.

1.3.2. Razmatranja pri korišćenju animalnih modela u proučavanju IUGR

Razmatranja pri korišćenju animalnih modela u proučavanju IUGR se odnose na broj fetusa, oblik placente i obim trofoblastne invazije.

Veliki broj potomaka u leglu ima prednosti jer se smanjuje broj životinja potrebnih za žrtvovanje, a razlike među polovima se lakše mogu proučavati. U leglima sa velikim brojem potomaka postoje i prirodni modeli IUGR zakržljalih mladunaca koji su *in utero* slabije ishranjeni jer su pozicionirani dalje u odnosu na a. uterinu i njene ogranke. Ovi spontani IUGR mladunci imaju znatno manju telesnu težinu u odnosu na “favorizovane” mladunce smeštene bliže a. uterini, manju jetru, bubrege i smanjenu koncentraciju IGF1 u plazmi i amnionskoj tečnosti (123,124). Trudnoće malih životinja pacova, miševa, zečeva traju znatno kraće (21-31 dan), te su ovakvi animalni modeli pogodni za izučavanje trans-generacijskih efekata zbog skraćivanja vremena koje je potrebno za prikupljanje podataka.

Oblik placente kod kreiranja animalnog modela je bitan zbog položaja fetoplacentalnog spoja preko koga se ostvaruje prenos kiseonika i hranljivih materija. Fetoplacentalni spoj može biti diskoidan kao kod humanih fetusa, difuzno raspoređen preko cele placente ili tačkasto razasut (125).

Obim kojim fetalni trofoblast prodire u maternalno tkivo i remodelira spiralne arterije je veoma bitan faktor u odlučivanju izbora animalnog modela. Ni kod jednog drugog organizma, osim kod čoveka, ne postoji tako izražena invazija trofoblasta, koja je u IUGR suboptimalna. Kod ljudi, trofoblastna invazija je ključna za adekvatan dotok krvi ka placenti, tako da miševi nisu prikladan model za istraživanje uzroka neadekvatnog remodeliranja spiralnih arterija, niti bilo koja intervencija koja ima za cilj promovisanje invazije trofoblasta (126).

1.3.3. Kreiranje animalnog modela fetalne restrikcije rasta

Kada se stvara animalni model IUGR, intervencije kojim se on kreira mogu biti na fetusu, majci ili genetske. Najčešće intervencije na fetusu su indukovanje hipoksije, davanje lekova, radioaktivnog joda ili inokulacija virusa (127). Intervencije na majci u stvaranju IUGR animalnog modela najčešće uključuju ligaturu a. uterine, restrikciju ishrane, hipertermički stres ili nedovoljnu oksigenaciju majke (128,129). Genetski modeli se uglavnom ispituju na miševima zbog bogatstva molekularnih informacija za tu vrstu i lakog pristupa embrionalnim matičnim ćelijama (130).

IUGR indukovano glukokortikoidima, prvenstveno deksametazonom je visoko relevantan. U radu *Ain* i saradnika analizirani su efekti ordiniranja deksametazona trudnim ženjkama pacova između 13. i 20. dana trudnoće. Utvrđeno je da deksametazon ne samo što indukuje IUGR nego i smanjuje masu placente za oko 50% što dovodi do disregulacije u lučenju placentalnog prolaktina, IGF2 i povećanja apoptoze ćelija placente (131). Lee sa kolegama je trudnim ženjkama miševa ordinirao deksametazon intraperitonealno u dve različite doze i u različitim danima gestacije. Došao je do zaključka da je veličina placente sa 11,5 dana gestacijske starosti obrnuto dozno zavisna (manja je težina placente kod davanja većih doza deksametazona), a sa 18,5 dana gestacijske starosti su se na žrtvovanim placentama videle i strukturne anomalije spongiotrofoblastnog tkiva, što sve zajedno dovodi do neadekvatne funkcije placente (132). Dokaze da glukokortikoidi ordinirani ženjkama trudnih pacova dovode do apoptoze ćelija placente i posledičnog IUGR su izneli u svom radu *Newnham* i saradnici, pri čemu je još uvek nejasno da li su ti efekti zbog direktne glukokortikoidne stimulacije proapoptotičnih gena unutar ćelija placente ili sekundarno zbog kompromitovane fetoplacentalne funkcije (133). U svom radu *Wyrwoll* ističe da je izlaganje fetusa glukokortikoidima ključni mehanizam koji dovodi do prenatalnog "programiranja" afektivnih bihevioralnih bolesti kao što su depresija i anksioznost. Tokom trudnoće enzim 11 β hidroksi-steroid-dehidrogenaza tip2 (11 β -HSD2) koja se nalazi u visokim dozama u placenti, predstavlja barijeru za dejstvo majčinih glukokortikoida. Blokodom ovog enzima dolazi do velike izloženosti fetusa glukokortikoidima koji mogu uticati na razvojne puteve zbog promena koje nastaju u hipotalamusno-hipofiznoj adrenalnoj osovini, serotonergičnim i kateholaminskim putevima (134).

Waddell je sa kolegama u svom radu ukazao na dejstvo glukokortikoida i karbenoksolona na placentalnu apoptozu. Korišćenjem DNK internukleozomalne fragmentacione analize utvrđeno je da glukokortikoidi dovode do apoptoze ćelija različitih regija placente pacova tokom poslednje nedelje trudnoće. Slično tome, terapija karbenoksolonom od strane trudnice povećava koncentraciju endogenih glukokortikoida inhibicijom enzima 11β hidroksi-steroid-dehidrogenaze te kao i deksametazon dovodi do placentalne apoptoze i smanjene težine placente i fetusa. Zaključak ovog istraživanja je bio da je apoptoza ćelija placente izražena u humanim trudnoćama komplikovanim IUGR i utvrđeno je da je animalni model pacova koristan za proučavanje endokrine kontrole placentalne apoptoze (135).

1.4. SERUMSKI CISTATIN C I KREATININ KAO POKAZATELJI FUNKCIJE BUBREGA KOD IUGR

Cistatin C je 13kDa protein koga stvaraju nukleotidne ćelije i bitan je za intracelularni katabolizam proteina. Ima malu molekularnu masu, slobodno se filtrira u glomerulima, skoro u potpunosti reapsorbuje u proksimalnim tubulima, potom katabolizuje i ne vraća ponovo u krvotok. Njegovo prisustvo u većim koncentracijama u urinu može da ukaže da postojanje oštećenja tubula. Serumske koncentracije cistatina C su nezavisne od mišićne mase, visine i pola, infekcije ili bilo koje ekstrarenalne problematike. Za razliku od uree i kreatinina ne prolazi placentu i bolji je za procenu jačine glomerularne filtracije (glomerul filtration rate-GFR) jer ne zavisi od funkcije bubrega majke (136-139).

Postoje različita iskustva o tome da li je serumski cistatin C bolji prediktor oštećenja bubrega kod preterminske novorođenčadi u odnosu na kreatinin. Po nekim autorima kod prevremeno rođene novorođenčadi sa malom telesnom masom cistatin C je signifikantno povećan u serumu do prve godine života i sugeriše na nezrelost bubrega (140). U svom radu *Malamitski-Puchne* i kolege su pretpostavili da se nivo serumskog cistatina C razlikuje kod IUGR novorođenčadi zbog smanjenog broja nefrona, u odnosu na novorođenčad sa normalnom telesnom masom. Rezultati su pokazali signifikantno niži nivo cistatina C u serumu IUGR novorođenčadi nakon

rođenja u čijoj osnovi može biti povećanje jačine glomerularne filtracije koje se javlja kao kompenzatorni mehanizam kod oštećene nefrogeneze ili smanjena proizvodnja cistatina zbog redukovane sinteze proteina (141).

Međutim, u svom radu *Sitapu* je izneo zaključak da ne postoji signifikantna razlika u koncentraciji serumskog cistatina C kod IUGR novorođenčadi u odnosu na kontrolnu grupu sa normalnom telesnom masom na rođenju, a do sličnih zaključaka su došli i drugi autori koji kod pretermijske novorođenčadi sa malom telesnom masom nisu dokazali prednost u određivanju serumskog cistatina C u odnosu na kreatinin pri proceni bubrežne funkcije (142,143). Vrednosti serumskog cistatina C su konstantne, u novorođenačkom uzrastu dvostruko veće od vrednosti koje dostižu nakon prve godine života. Nekoliko studija je ukazalo na povišene vrednosti serumskog cistatina C u krvi prematurnih novorođenčadi (144).

U slučaju prevremeno rođenih novorođenčadi male telesne mase i gestacijske starosti od 28-34 nedelje, nije dokazana signifikantna korelacija između gestacijske starosti i vrednosti serumskog cistatina C. Kao što je poznato, kod pretermijske novorođenčadi postoji pozitivna linearna korelacija između GFR i gestacijske starosti, odnosno što je prematuritet izraženiji to je niža GFR. Odsustvo signifikantne veze između gestacije i cistatina C zahteva dalja objašnjenja koja bi koristila inulin-klirens kao standard da bi se definitivno utvrdilo da li je cistatin C od većeg značaja za procenu oštećenja bubrežne funkcije, odnosno GFR u odnosu na kreatinin (145).

Serumski kreatinin je široko prihvaćen marker bubrežne funkcije. On je važan i pouzdan indikator stanja bubrega jer je njegov biološki referentni interval u serumu relativno konstantan tokom života. Endogeno se stvara u mišićima i filtrira u glomerulima. Za razliku od uree ne reapsorbuje se u tubulima i dobar je marker jačine glomerulske filtracije. GFR je niska u fetalnom i neonatalnom životu, postepeno raste i u uzrastu od mesec dana iznosi oko 20ml/min/1,73m², kako kod terminskih tako i kod pretermijskih neonatusa. Nivoi serumskog kreatinina kod novorođenčadi su uslovljeni telesnom masom, gestacijskom starošću, kao i brojem nefrona na rođenju.

Kod IUGR novorođenčadi nivo serumskog kreatinina je znatno veći nego kod novorođenčadi sa normalnom telesnom masom na rođenju, ali je nepouzdan indikator oštećenja bubrega u ranoj fazi jer se njegova koncentracija ne menja dok 25-50% funkcije bubrega nije izgubljeno (146-148). Određen broj autora upozorava da visoke koncentracije serumskog kreatinina kod novorođenčadi male telesne mase u prvim danima nakon rođenja mogu biti odraz nezrelosti bubrega preterminskih neonatusa udružene sa serumskim kreatininom majke.

1.5. PLACENTALNI HORMON RASTA (Placental growth hormone-PGH)

1.5.1. Poreklo PGH

PGH je 22kD polipeptid, strukturalna varijanta hipofiznog hormona rasta od koga se razlikuje u 13 aminokiselina. Prvi put je opisan 1985. godine i sastoji se od 191 aminokiselinskog ostatka. Pripada grupi humanih hormona rasta (growth hormones-GH) koji su produkti pet gena, članova GH-gen familije locirane na dugom kraku hormozoma 17 (q22-q24). Ovi geni kodiraju hormon rasta hipofize (GH-N gen), placentalni hormon rasta (GH-V gen) i tri horionska somatomamotropna/placentalna laktogena (hCS-A, hCS-B, hCS-L geni). PGH je produkt GH-V gena (growth hormone-variant gene) i specifično se stvara u sloju sinciciotrofoblasta i ekstraviloznog citotrofoblasta ljudske placentе (149,150).

Liebhaber je 1989. god. opisao da se za razliku od hormona rasta hipofize, GH-V iRNK nalazi isključivo u placenti (151). Za razliku od prethodnih stavova da se PGH može detektovati samo u cirkulaciji majke i da time samo neposredno utiče na rast fetusa, istraživanja su ukazala da se može naći i u amnionskoj tečnosti i pupčaniku, ali nikada u krvi fetusa (152,153). Međutim, najnovija ispitivanja nivoa PGH u trudnoćama komplikovanim preeklampsijom su koristila imunosorbentne radioeseje sa najnižom stopom detekcije od 0,01ng/ml, čime je prvi put detektovan PGH u fetalnoj krvi. Autori su zaključili da je to

najverovatnije zbog toga što na aktuelni imunosorbentni esej ne utiče prisustvo vezujućeg proteina za hormon rasta (154).

U svom istraživanju *Higgins* sa kolegama je iz krvi pupčanika komparirao nivoe PGH, nakon porođaja trudnica koje su imale dijabetes melitus tip 1 i zdravih trudnica. Došli su do zaključka da je u trudnoćama komplikovanim dijabetesom povećan nivo PGH i da korelira sa većom porođajnom težinom novorođenčeta. Takođe, u tim trudnoćama je narušena normalna PGH-IGF1-IGBP3 osovina te je rizik od makrozomije ploda povećan (155).

1.5.2. PGH sekrecija tokom normalne trudnoće

Placentalni hormon rasta je glavni hormon koji se luči tokom trudnoće zajedno sa insulinu sličnom faktorom rasta 1 (156).

Na početku trudnoće hormon rasta hipofize je glavni hormon rasta koji ispoljava visoko pulsatilnu 24h koncentraciju u krvi majke (157). Ispitivanjem PGH specifičnim monoklonskim antitelima ustanovljeno je da se on u cirkulaciji majke pojavljuje od pete gestacijske nedelje, a od 15. nedelje pa sve do kraja trudnoće PGH postepeno zamenjuje hormon rasta hipofize čija koncentracija opada na nepromenljive vrednosti. PGH se u cirkulaciju majke luči na nepulsatilni, kontinuirani način koji je važan zbog fizioloških promena u metabolizmu majke tokom trudnoće, kao i zbog kontrole majčinih IGF1 nivoa. Smatra se da je PGH ključan u regulaciji majčinih IGF1 nivoa (158). Jedan do tri sata nakon porođaja, zbog vrlo kratkog perioda poluraspada, postaje nedetektabilan u cirkulaciji majke (159). Koncentracija PGH je veća u serumu majki koje nose ženske fetuse, što sugerise na povećanje sinciotrofoblastne mase ili povećanu trofoblastnu sekreciju hormona u ovim trudnoćama (160).

1.5.3. Fiziološka uloga PGH tokom trudnoće

U tkivima majke PGH stimuliše glukoneogenezu, lipolizu i anabolizam čime ispoljava somatotropni efekat: utiče na fetalni rast, razvoj placente, snabdevanje fetoplacentalne jedinice nutritivnim i adaptaciju majčinog organizma na trudnoću. Najveći deo ovih aktivnosti se

obavlja indirektno, dejstvom na majčin IGF1, dok direktan uticaj na fiziološki razvoj placente PGH vrši preko ekstraviloznog trofoblasta, kombinacijom autokrinih i parakrinih mehanizama što je sugerisano prisustvom specifičnih receptora hormona rasta u ovom tkivu (161,162). PGH ima malu laktogenu aktivnost i prvenstveno se vezuje za somatogene receptore (163).

Sekrecija PGH je obrnuto srazmerna u odnosu na koncentraciju glukoze i insulina u krvi majke i nije regulisana PGH - oslobađajućim hormonom. PGH osigurava adekvatno snabdevanje fetusa glukozom, omogućavajući dopremanje hranljivih nutritijenata ka fetusu direktno ili indirektno putem IGF1. Pošto se glavni transporter glukoze, glutamin 1, luči u sinciotrofoblastnim ćelijama, one prilagođavaju sekreciju PGH u zavisnosti od koncentracije glukoze u krvi majke. Kod gestacijskog dijabetesa, za vreme izvođenja oralnog testa opterećenja glukozom, smanjuje se PGH nivo u krvi majke (156, 164). Veza između fetalnog rasta i PGH povećava mogućnost da PGH bude jedan od faktora u razvoju insulinske rezistencije u trudnoći i može igrati važnu ulogu u razvoju gestacijskog dijabetes melitusa (165,166).

Kao što je prethodno rečeno, u studiji *Higginsa*, ali i u drugim studijama utvrđen je povećan nivo PGH u trudnoćama žena sa dijabetes melitusom, pri čemu je još uvek nepotpuno jasno da li je PGH uključen u regulaciju rasta fetusa trudnice koja ima dijagnostikovan dijabetes tip 1 ili samo u trudnoćama koje su komplikovane gestacijskim dijabetes melitusom (155,167). U najvećem broju studija su izneti rezultati normalnih ili čak sniženih nivoa PGH u serumu majki sa dijabetesom tip 1, dok kod gestacijskog dijabetesa PGH doprinosi regulaciji insulinske rezistencije i može uticati na fetalni rast modifikovanjem raspoloživih nutritijenata i dejstvom na rast placente posredstvom parakrinih mehanizmima (168).

1.5.4. PGH i fetalni rast

Placenta doprema majčinu krv koja sadrži kiseonik i hranljive nutritijente do fetusa i time utiče na njegov rast i razvoj. Placentalni hormoni rasta zajedno sa hormonom rasta hipofize utiču na metaboličke promene tokom trudnoće, ali i sami prolaze kroz različite promene u zavisnosti od gestacijske starosti (169). Hormon rasta hipofize se luči u visokim koncentracijama na početku trudnoće. Sredinom trudnoće dolazi do njegovog naglog pada, a od 24. gestacijske nedelje on se

više ne može detektovati u krvi majke. Funkciju hormona rasta preuzima PGH čije maksimalne koncentracije su od 20. nedelje gestacije do samog kraja trudnoće.

Prema hipotezi fetalnog porekla bolesti dobro je poznato da dijabetes tip 2 i metabolički sindrom su povezani sa IUGR i malom telesnom masom na rođenju (65). Fiziološka uloga PGH u trudnoći još uvek nije u potpunosti razjašnjena, ali njegova visoka kontinuirana sekrecija može uticati na rast placente, a time neposredno i na rast fetusa (170).

U velikoj studiji *Bentona* i saradnika 14 dana nakon ultrazvučno dijagnostikovanog zastoja u rastu, trudnicama je uzeta krv radi određivanja koncentracije PGH. Rezultati su pokazali da je nizak nivo PGH trudnica sa visokom senzitivnošću bio povezan sa IUGR fetusa i da normalni nivoi cirkulišućih PGH mogu biti od koristi za isključivanje placentalnog razloga IUGR, pogotovo pre 35. gestacijske nedelje (171,172). Snižene vrednosti PGH su povezane i sa prisustvom fetalnih hromozomskih abnormalnosti. U studiji *Frendo* i saradnika *in vitro* je izolovan citotrofoblast iz 15 trudnoća pogođenih Daunovim sindromom i iz 10 normalnih trudnoća. Dokazano je da postoji abnormalna formacija sinciotrofoblasta kod Daunovog sindroma, koja dovodi do dramatičnog smanjenja sinteze i sekrecije hormona placente uključujući PGH, humani placentalni laktogen i leptin. To je pridonelo boljem razumevanju promena u hormonima placente koji se mogu koristiti kao biomarkeri za dijagnostiku Daunovog sindroma, odnosno dat je zaključak da sinciotrofoblast igra ključnu ulogu tokom trudnoće (173). Sa druge strane *Moghadam* je u svom radu izneo zaključak da je u trudnoćama koje su praćene hromozomskim anomalijama ili oštećenjima neuralne cevi povećan nivo majčinog cirkulišućeg PGH (174).

Različite studije su dokazale smanjene vrednosti PGH u cirkulaciji majke tokom trudnoće komplikovane IUGR. To je sugerisalo da PGH odražava biološku aktivnost placente i može biti koristan marker za procenu hroničnog fetalnog distresa povezanog sa placentalnim abnormalnostima u strukturi i funkciji (175). Kod IUGR modela, niske vrednosti PGH u majčinoj cirkulaciji nisu samo rezultat smanjene veličine placente, već i abnormalnog razvoja placentalnog tkiva ili abnormalne sinteze PGH (176). Redukovana količina PGH dovodi do smanjene lipolize i nivoa cirkulišućeg IGF1 što može dovesti do smanjene dostupnosti hranljivih materija, limitiranog placentalnog transfera nutrijenata i sledstveno do smanjenja

telesne mase na rođenju (177). Po nekim teorijama smanjenje lipolize zbog PGH deficita može biti povezano sa gojaznošću majke, međutim ove teorije su kontroverzne jer najveći broj IUGR novorođenčadi je iz trudnoće majki sa niskim indeksom telesne mase (178).

Neki autori su došli do zaključka da nivo majčinog PGH je povezan sa povećanjem biparijetalnog dijametra tokom prvog trimestra trudnoće uz ostale poznate i nepoznate činioce, što je dovelo do zaključka da PGH može pridoneti regulaciji fetalnog rasta od samog početka trudnoće (179). Dalja ispitivanja su potrebna da bi se sa sigurnošću mogla utvrditi uloga PGH u IUGR trudnoćama. Postavljeno je pitanje da li smanjena koncentracija PGH samostalno deluje kao uzrok IUGR, jer za razliku od većine iznetih studija, postoje i one koje su iznale rezultate da u trudnoćama koje su završene rođenjem IUGR novorođenčadi, koncentracija PGH između 11-13. gestacijske nedelje je bila normalna (152).

1.6. INSULINU SLIČAN FAKTOR RASTA 1 (INSULIN LIKE GROWTH FACTOR 1 - IGF1)

1.6.1. Poreklo IGF1

IGF1 i IGF2 su prvi put opisali *Salmon i Daughaday* 1957. godine kao tzv. sulfidne faktore koji su in vitro promovisali ugradnju sulfata u hrskavicu pacova (180). Potom je *Froesch* opisao nesupresivnu, insulinu sličnu aktivnost dve rastvorljive komponente seruma (NSILA I, II). 1972. godine prethodni nazivi su zamenjeni sa terminom somatomedin. Opisana su tri različita somatomedina: somatomedin C (IGF1), somatomedin A (IGF2), somatomedin B. 1976. godine *Rinderknecht i Humbel* su izolovali dve aktivne supstance iz humanog seruma koje su zahvaljujući svojoj strukturi koja je podsećala na proinsulin dobile naziv insulinu sličan faktor rasta 1 i 2 (IGF1 i IGF2) (181-183).

IGF1 je medijator anaboličke i mitogene aktivnosti hormona rasta (GH). To je polipeptid koji se sastoji od 70 aminokiselina u jednom lancu sa tri intermolekularna disulfidna mosta i ima molekularnu težinu 7,6kDa. Preko 60% je homologan sa IGF2 i oko 50% sa proinsulinom.

Slično insulinu, u svojoj strukturi sadrži A i B lanac koji su međusobno povezani disulfidnim vezama. Strukturna sličnost sa insulinom omogućava sposobnost IGF1 da se vezuje za insulinske receptore. IGF1 gen je lociran na dugom kraku hromozoma 12 (12q23) (184).

U plazmi 99% IGF1 je vezano za protein koji moduliše raspoloživost slobodnog IGF1 tkivima. Postoji šest vezujućih proteina, pri čemu kod ljudi, 75% cirkulišućeg IGF1 je vezano za IGFBP3 (insulin like growth factor binding protein 3), trojni kompleks koji se sastoji od jednog molekula IGF1, jednog molekula IGFBP3 i jednog 88kDa proteina koji je acidolabilan (acid labile subunit). Oko 20% IGF1 seruma je vezano u dvojnog kompleksu zajedno sa IGFBP i oko 5% cirkuliše slobodno, sa kratkim vremenom poluraspada oko 10 minuta (185).

IGFBP1 je regulisan insulinom, IGFBP3 uglavnom GH i jednim delom sa IGF1 (186). Sinteza i lučenje IGF se odvija tokom celog života, najmanje u ranom detinsjtvu i starosti, a najviše u pubertetu.

1.6.2. Fiziološka uloga IGF1

IGF1 igra značajnu ulogu u rastu, razvoju i metabolizmu. Značajan je za rast i proliferaciju tkiva, kao antioksidant i faktor koji usporava starost tkiva. Zbog ovako velikog raspona njegovih fizioloških uloga IGF1 nivoi moraju striktno biti kontrolisani.

Sinteza IGF1 se najvećim delom odvija u jetri, ali i u raznim mezenhimalnim ćelijama, praktično svako tkivo može da proizvede IGF1 (187). Kao rezultat toga postoje dva osnovna mehanizma IGF1 regulacije: IGF1 koji se sintetiše u jetri i luči u krvotok je pod kontrolom hormona rasta hipofize i deluje kao endokrini hormon, dok autokrini/parakrini IGF1 sinteza u perifernim tkivima, kao što su kosti i hrskavica je kontrolisana i od strane hormona rasta hipofize i od strane ćelija lokalnih tkiva. Određena količina ovih autokrini/parakrinih stvorenih IGF1 se luči i u sistemsku cirkulaciju, tako da razumevanje ove autokrine/parakrine sinteze IGF1 je neophodno da bi se mogle interpretirati promene u koncentraciji cirkulišućih IGF1 nivoa. Svoju autokrinu funkciju IGF1 može ispoljavati i kao onkogen (188).

IGF1 ispoljava svoje efekte preko aktivacije IGF1 receptora. Postoje najmanje dva receptora za vezivanje IGF1 na površini ćelija. Takozvani “fiziološki” receptor tirozin - kinaza vezuje IGF1 sa velikim afinitetom, za razliku od drugog insulinskog receptora za koji se IGF1 vezuje sa nižim afinitetom. Svi oni imaju ulogu u ćelijskom životu, rastu i proliferaciji. Ovi receptori su široko raspostranjeni, što omogućava transport IGF1 putem krvi do različitih tkiva i organa. Suprotno tome, autokrini/parakrini IGF1 stimulišu lokalni rast, koji ne zavisi od sistemskog hormona rasta. Primeri za to su zarastanje rane ili povećanje rasta kontralateralnog bubrega nakon nefrektomije (189,190).

Fiziološka uloga IGF1, kao samostalnog hormona odvojenog od dejstva hormona rasta se još uvek otkriva. Za razliku od hepatične produkcije IGF1 koja jeste pod uticajem hormona rasta i hranljivih nutritijenata, sinteza IGF1 u uterusu i jajnicima nije pod kontrolom hormona rasta, već estrogena i folikulostimulišućeg hormona. IGF1 povećava proliferaciju granuloznih ćelija, steroidogenezu kao i rast oocita (191,192). Testikularna funkcija IGF1 je isključivo autokrini/parakrini, bez endokrine komponente u smislu postojanja cirkulišućih IGF1 hormona. Za sada ostaje nepoznato zašto IGF1 stimuliše regeneraciju jetre nakon resekcije jednog njenog dela, dovodeći do hepatocitne proliferacije i ubrzanja DNK sinteze efikasnije i bolje nego što ima uticaj na rast intaktne jetre (193).

Davanje IGF1 glodarima povećava rast bubrega, protok krvi kroz bubrege kao i stopu glomerularne filtracije. Shodno tome, smatra se da te iste uticaje IGF1 ima i na humane bubrege sugerišući da on može biti i regulator bubrežne funkcije. U slučaju unilateralne nefrektomije smanjuju se nivoi IGF1 u preostalom bubregu, a povećava veličina istog (194).

U animalnom modelu miša sa globalnom inaktivacijom IGF1 smanjuje se veličina bubrega, glomerula i redukuje se broj nefrona. Demonstrirana je uloga IGF1 u održavanju glomerularnog integriteta, normalne strukture podocita i inhibicije apoptoze podocita. Kod ljudi IGF1 povećava protok krvi kroz bubrege za oko 25%, pri čemu dovodi do povećane retencije natrijuma dejstvom na tubule i supresijom sekrecije natriuretičkog peptida. U bubrezima dijabetičara IGF1 ima i zaštitnu ulogu protiv oksidativnog stresa i apoptoze indukovane visokim nivoima glukoze u kulturi mezengijalnih ćelija. Ova saznanja mogu dovesti do terapijskog dejstva IGF1 u cilju prevencije ćelijske smrti i progresije nefropatije (194,195).

U miokardu i glatkomišićnom sloju i endotelu aorte postoji veća senzitivnost na IGF1 nego na insulin. Njegovo dejstvo na kardiovaskularni sistem je kako preko endokrinih, tako i preko parakrinih/autokrinih efekata. Funkcija IGF1 kao potentnog vazodilatatora je delimično uslovljena povećanim oslobađanjem azot oksida iz endotela (196).

Mnogobrojne studije su pridonele otkriću uticaja IGF1 na imunološki sistem. Dokumentovane su interakcije između citokina kao proinflamatornih ćelija i IGF1, uticaja IGF1 na T-limfocite (porast CD4+ CD8+ nezrelih limfocita u slezini i timusu pacova) i na B limfocite povećavajući proizvodnju interleukina 7 (197). Makrofagi i granulociti su takođe senzitivni na dejstvo IGF1 delujući kao IGF1 receptori (198).

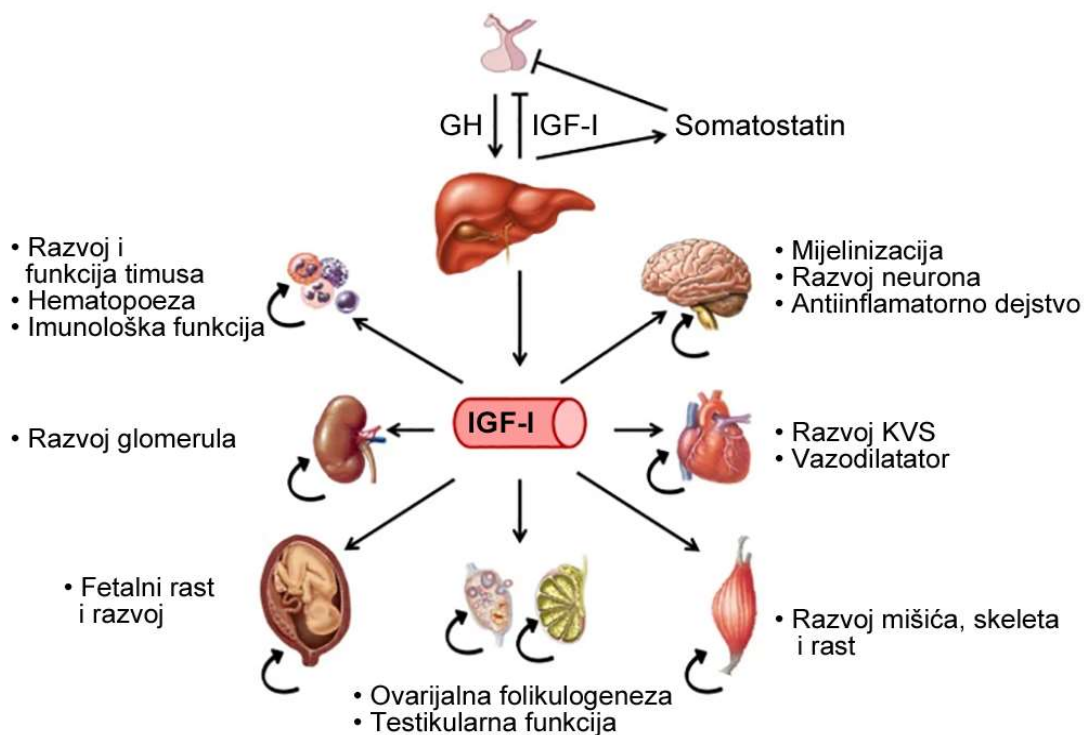
1988. godine *Mathews* i kolege su na animalnom modelu transgenskog miša koji je nosio himerični gen u čijem sastavu je bio IGF1, ustanovili značajno povećanu telesnu masu miševa oba pola, tokom puberteta i daljeg života. Brojni organi su bili zahvaćeni hiperplazijom što je indikovalo da IGF1 od rođenja do puberteta dovodi do proporcionalnog povećanja svih tkiva. Ovo povećanje u veličini i težini organa nije bilo praćeno longitudinalnim ubrzanjem skeletnog rasta, jer su i tibija i radijus eksperimentalnih miševa bile jednake dužine kao i u kontrolnoj grupi (199).

U slučaju oštećenja osovine GH/IGF1 dolazi do promena u skeletu, veličini, obliku kostiju i vremenu osifikacije kao i do promena u kompoziciji tela. Do kakvih posledica na rast će doći zavisi od pola, uzrasta, genetske podloge i mesta GH/IGF1 osovine u kome postoji oštećenje. Konstruisani su i opisani različiti animalni modeli miševa sa promenama u GH/IGF1 osovini da bi se ustanovilo kakve promene u ljudskom organizmu donosi takav poremećaj.

GH/IGF1 osovina menja hondrocite proliferativne i hipertrofične zone rasta. IGF1 utiče na rast kostiju i reguliše kortikalna i trabekularna svojstva kostiju preko uticaja na funkciju osteoblasta, osteocita i osteoklasta. Interakcija između IGF1, polnih hormona i paratireoidnih hormona demonstrira značajnost i kompleksnost IGF1 osovine skeleta. IGF1 ima uticaja i na starenje skeletnog sistema jer dovodi do redukcije u mineralizaciji kosti, njenoj smanjenoj gustini i povećanim rizicima za frakturu (200).

I GH i IGF1 imaju nezavisne i sinegriističke efekte u promociji postnatalnog rasta. Na modelu transgenetskog miševa sa duplom inaktivacijom GH receptora i IGF1, kao što je bilo očekivano došlo je do teške redukcije u telesnoj dužini miševa (201). Malo se zna o načinima regulacije IGF1 u mozgu, ali se zna da faktori rasta, ishrana i povrede moždanog tkiva (hipoksično-ishemične, stereotaktične, elektrolitne ili kriogene) kao i indukovani demijelinizacioni i eksperimentalni autoimuni encefalomijelitisi utiču na njegovu *in vivo* ekspresiju. Ipak, koncentracija IGF1 iRNK u mozgu hipofizektomiranih pacova je redukovana i nakon infuzije GH iRNK IGF1 se vraća na 80% svojih normalnih vrednosti, što znači da GH ima važnu ulogu u modulaciji IGF1 u mozgu (202). U prilog teoriji da se uloga GH u razvoju CNS-a ne sme potciniti je i istraživanje u kome se kod transgenetskih miševa u slučaju deficita GH verifikovao manji mozak nego kod normalnih miševa. Međutim, u slučaju deficita IGF1 mali broj miševa je preživeo neposredno nakon rođenja, a preživeli su imali mozak za oko 60% manji u odnosu na normalne miševе iz kontrolne grupe, sa smanjenjem bele mase zbog smanjene mijelinizacije i smanjenog broja aksona (203).

Deficit IGF1 u detinjstvu može biti izolovan ili udružen sa deficitom ostalih hormona rasta. Nekada se javlja u sklopu malignih bolesti zbog tumora hipofize, kranijalnog zračenja ili intratekalne terapije. Najveći broj slučajeva GH rezistencije u detinjstvu je blagog ili umerenog stepena i leči se supstitucijom istih. Ozbiljna GH rezistencija je retka i obično prouzrokovana deficitom GH receptora ili mutacijama IGF1, IGFBP i IGF-receptora. Ovi pacijenti ne reaguju na terapiju hormonom rasta, ali mogu imati pozitivan odgovor na rekombinantnu IGF1 terapiju, osim u slučaju kada je uzrok patologije oštećenje IGF1-receptora.



Slika 6. GH/IGF1 osovina

Preuzeto: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-10-224>

1.6.3. IGF1 I IUGR

Postoje dokazi o tome da GH nije jedini odgovoran za normalan rast *in utero* jer njegov nedostatak ne dovodi do značajnog smanjenja porođajne težine i dužine. Suprotno njemu mutacije IGF1 ili njegovih receptora dovode do smanjenja intrauterusnog rasta, što znači da je uloga IGF1 na intrauterusni rast nezavisna od GH (204).

Dok deficit GH dovodi samo do blagih formi zastoja u rastu, deficit IGF1, kako kod transgenskih miševa (izazvan delecijom), tako i kod ljudi izaziva ozbiljnu postnatalnu retardaciju rasta sa neurološkim oštećenjem (205). IGF1 kontroliše rast fetusa nezavisno od sekrecije GH. Pod ovim uslovima, placentalni hormon rasta može igrati ulogu primarnog regulatora IGF1 seruma majke tokom trudnoće, jer je ustanovljena niska ekspresija placentalnog IGF1 tokom IUGR. Generalno,

endokrini milje humanog fetusa sa intrauterusnom restrikcijom rasta karakterišu niski cirkulišući nivoi insulina, IGF1, IGF2, IGFBP3 i visoki nivoi GH i IGFBP1 (206,207).

Prema hipotezi štedljivog fenotipa, GH/IGF1 osovina se može programirati rano u životu. Ovo fetalno programiranje može biti uključeno u najmanje dva patološka stanja u kasnijem životu: insulinsku rezistenciju i hipertenziju (70,74).

Deca sa IUGR pokazuju oštećenu GH/IGF1 osovinu što može doprineti smanjenoj osetljivosti na insulin i rezistenciji na IGF1, jer su potrebni viši bazalni i GH- indukovani IGF1 nivoi kako bi se postigla brzina rasta slična rastu normalne dece. Takvo stanje sekundarno dovodi do kompenzatorne hiperinsulinemije u cilju suprotstavljanja insulinskim antagonističkim efektima hormona rasta i oštećenoj regulaciji prenosa glukoze putem insulina u mišićima i masnom tkivu (208). Fetalni odgovor na hipoksiju usled IUGR uključuje regulaciju insulina, IGF1, IGF2 i povećanu ekspresiju inhibitora IGFBP. Hipoksija aktivira hipotalamusno-hipofizno-adrenalnu osovinu povećavajući plazma nivoe adrenokortikotropnog hormona i kortizola.

Rast bubrega je takođe pod kontrolom IGF1, njegova smanjena aktivnost paralelno sa povećanim nivoima kortizola rezultira u smanjenom broju glomerula. Takođe, izmene u renin-angiotenzin-aldosteron sistemu su učestale usled aktivacije hipofizno-hipotalamusno-adrenalne osovine što zajedno sa kompenzatornim odgovorom na smanjenu bubrežnu funkciju dovodi do arterijske hipertenzije. Još davne 1966. godine *Laron* je opisao sindrom patuljastog rasta sa visokim vrednostima GH, ali sa hipoprodukcijom IGF1. Ovaj sindrom GH rezistencije dobio je ime Laronov sindrom, a molekularne studije su dokazale da je uzrok GH rezistencije delecija i mutacija u GH-genskom receptoru što dovodi do greške u sintezi IGF1 kao i IGFBP3. U Laronovom sindromu tj. primarnoj IGF1 deficijenciji, novorođenčad imaju manju telesnu dužinu na rođenju (42-47cm), što znači da IGF1 *in utero* utiče na rast fetusa. Kod ove dece odložena je maturacija skeleta i usporen rast svih organa. Konačna visina odrasle ženske osobe je do 135cm, a odrasle muške osobe do 142cm (209).

Brojne studije su dokazale povezanost između IUGR i deficita IGF1. Rasmussen je razmatrao da li su IGF1 i IGF1-receptor (IGF1R) zaslužni za malu porođajnu masu, insulinsku rezistenciju i dijabetes tip 2 pri čemu nije pronašao ni jednu mutaciju u DNK genomu. Autori su doneli

zaključak da varijabilnost u regionima DNK koji kodiraju IGF1 i IGF1R nije povezana sa redukovanom porođajnom masom, insulinskom rezistencijom niti dijabetesom kod 82 ispitivane familije u Danskoj (210).

Za razliku od ovih autora *Arends* je 2002. izneo hipotezu da genetski determinisani niski IGF1 nivoi mogu dovesti do redukcije u porođajnoj težini, dužini i obimu glave, kao i do perzistentno niskog rasta u daljem životu. Takođe je pretpostavio da IGF1 gen može biti veza između male porođajne mase, dijabetesa tip 2 i kardiovaskularnih bolesti (211).

IUGR	Dijabetes	Opekotine
Laron sy (primarna IGF1 def.)	Insulinska rezistencija	Kronova bolest
ROP	Metabolički sindrom	Vernerov sy
Starenje	Osteoporoza	X vezana komb. imunodef.
Neurološki poremećaji	Cistična fibroza	Ciroza jetre
Moždani udar	Zarastanje rana	Anoreksija
Povreda kičmene moždine	Miotonična distrofija	Prevenција gubitka sluha
Kardiovaskularna protekcija	Slabost mišića kod AIDS	

Tabela 1. Patologija potencijalno pogodna za lečenje preparatom IGF1 (212)

Za sada, idealne doze i način doziranja IGF1 još uvek nije u potpunosti ustanovljen. Registrovan je preparat rekombinantnog humanog IGF1 koji ima istu hemijsku strukturu i deluje na isti način kao i prirodni IGF1. Kriterijumi za davanje ovog preparata kod primarne IGF1 deficijencije su $TV < 3SD$ za dati uzrast, nivo serumskog IGF1 $< 2,5$ percentila i normalna vrednost GH (213).

Ispitivanja su pokazala da je razumno dati takve doze IGF1 koje bi održavale njegovu koncentraciju u fiziološkim granicama, uz maksimalno izbegavanje predoziranja zbog izraženih, iako u najvećem delu reverzibilnih nuzefekata, u koje se ubrajaju tahikardija, povećanje intrakranijalnog pritiska praćeno glavoboljom i povraćanjem, artralgija, hipoglikemija, edem lica, ortostatska hipotenzija, hiperplazija limfoidnog tkiva i gojaznost.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I RADNE HIPOTEZE

2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na eksperimentalnom modelu intrauterusne restrikcije rasta (Naval Medical Research Institute NMRI miševi) ispitati sledeće ciljeve:

Cilj 1: Ispitati da li intrauterusna restrikcija rasta utiče na smanjenje broja glomerula bubrega.

Cilj 2: Ispitati da li primena insulinu sličnog faktora rasta 1 (IGF1) nakon rođenja miševa sa intrauterusnom restrikcijom rasta utiče na broj i veličinu glomerula

Cilj 3: Ispitati da li primena placentalnog hormona rasta (PGH) nakon rođenja miševa sa intrauterusnom restrikcijom rasta utiče na broj i veličinu glomerula.

Cilj 4: Ispitati da li je bubrežna funkcija bubrega miševa sa intrauterusnom restrikcijom rasta, koji su nakon rođenja dobili IGF1 i PGH, u adultnoj dobi statistički značajno bolja u odnosu na one koji nisu dobili IGF1 i PGH.

2.2. RADNE HIPOTEZE

Hipoteza 1: Miševi koji su nakon rođenja dobili IGF1 imaju u adultnoj dobi veći broj glomerula.

Hipoteza 2: Miševi koji su nakon rođenja dobili PGH imaju u adultnoj dobi veći broj glomerula.

Hipoteza 3: U adultnoj dobi, bubrežna funkcija miševa sa intrauterusnom restrikcijom rasta koji su nakon rođenja dobili IGF1 i PGH je statistički značajno bolja u odnosu na one koji nisu dobili IGF1 i PGH.

3. MATERIJAL I METODE

Ispitivanje je sprovedeno kao eksperimentalna laboratorijska studija u Zavodu za antirabičnu zaštitu - Pasterov zavod Novi Sad.

Za izvođenje eksperimentalnih protokola na oglednim životinjama dobijena je saglasnost etičke komisije za zaštitu dobrobiti eksperimentalnih životinja Univerziteta u Novom Sadu.

U eksperimentu su korišćeni miševi rase NMRI (Naval Medical Research Institute). Odrasle ženke su uzgajane u gajilištu Pasterovog zavoda u Novom Sadu, u kavezima namenjenim za uzgoj sitnih laboratorijskih životinja, u standardnim laboratorijskim uslovima sa hranom i vodom ad libitum.

Korišćen je eksperimentalni model IUGR. Ženke su u toku 24h bile spojene sa polno zrelim mužjacima, a nakon toga se na osnovu prisustva sperme u vaginalnom brisu mišice utvrdilo da li je začela. Ako se utvrdilo prisustvo spermatozoida to se vodilo kao nulti dan gestacije. Gestacija kod miševa rase NMRI traje 19-21 dan. Od 15 - 21. dana, odnosno do dana porođaja, gravidne ženke su dobijale Deksametazon (razblažen sa 0,9%NaCl) supkutano, u dozi od 100 μ g/kg/dan (0,2ml).

Kriterijumi za isključenje iz studije su miševi rođeni iz trudnoće sa manje od šest fetusa i više od 10 fetusa.



Slika 7. Gravidne ženke u kavezima za uzgoj sitnih laboratorijskih životinja sa hranom i vodom



Slika 8. Supkutano davanje deksametazona gravidnim ženkama



Slika 9. Kavez sa mladuncima nakon spontanog porođaja



Slika 10. Mladunci u kavezu na prirodnoj ishrani

Po metodi slučajnog izbora mladunci su razvrstani u jednu od sledećih grupa i ostavljeni na prirodnoj ishrani (sisanje) naredne četiri nedelje.

I grupa: 10 miševa sa intrauterusnom restrikcijom rasta kojima je po rođenju intraperitonealno aplikovan placentalni hormon rasta (PGH) – 2 μg .

II grupa: 10 miševa sa intrauterusnom restrikcijom rasta kojima je po rođenju intraperitonealno aplikovan placentalni hormon rasta (PGH) – 10 μg .

III grupa: 10 miševa sa intrauterusnom restrikcijom rasta kojima je po rođenju intraperitonealno aplikovan insulinu sličan faktor rasta 1 (IGF1) – 1 μg .

IV grupa: 10 miševa sa intrauterusnom restrikcijom rasta kojima je po rođenju intraperitonealno aplikovan insulinu sličan faktor rasta 1 (IGF1) – 10 μg .

V grupa: Kontrolna grupa I - 10 miševa koji su se spontano okotili, bez prethodne intervencije na majci i bez intervencije na njima nakon rođenja.

VI grupa: Kontrolna grupa II: 10 miševa sa intrauterusnom restrikcijom rasta kojima je intraperitonealno aplikovan 0,1ml 0,9% NaCl.



a.



b.

Slika 11a,b. Intraperitonealno aplikovanje PGH i IGF1 mladuncima miševa

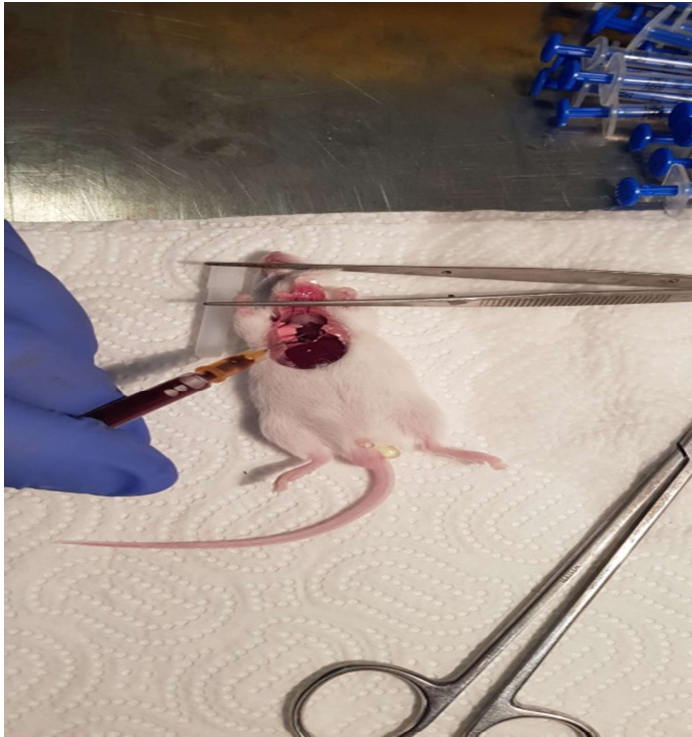
3.1. HISTOLOŠKA OBRADA MATERIJALA

Histološka obrada materijala i morfometrijska analiza je urađena na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu, Institut za histologiju i embriologiju.

Posle 4 nedelje eksperimentalnim mladuncima miševa je izmerena telesna masa i potom su žrtvovani nakon uvođenja u opštu anesteziju inhalatornim anestetikom izofluran. Žrtvovanim životinjama se vertikalno rasekao grudni koš skalpelom, insulinskim špricom i iglom iz srca se uzelo 0,5ml krvi za određivanje koncentracije cistatina C i kreatinina. Potom je kod svih ispitivanih jedinki uzet po jedan bubreg koji je potopljen u 10% rastvor puferisanog formalina na +4°C tokom 24h.

Bubrezi jedne eksperimentalne grupe objedinjeni su istoj bočici (10 bubrega po bočici).

Po fiksaciji, od svakog bubrega, uzet je centralni poprečni isečak debljine 3mm kojim je bio obuhvaćen hilus bubrega (slika 14a). Svi isečci jedne grupe dehidrirani su zajedno i ukalupljeni u jedan parafinski kalup (slika 14b). Kalupi su sečeni na rotacionom mikrotomu (*Leica, Nemačka*) pri debljini od 5µm na dva susedna reza od kojih je jedan bojen metodom hematoksilin i eosin (H&E), a drugi metodom Periodic Acid-Schiff (PAS) koje su detaljno opisane u literaturi (Slika 14c) (214).



Slika 12. Uzimanje krvi insulinskim špricom i iglom iz srca, za analizu cistatina C i kreatinina



Slika 13. Ekstirpacija bubrega za histološku obradu

3.2. DIGITALIZACIJA HISTOLOŠKIH PRESEKA I PRIPREMA ZA MORFOMETRIJSKU ANALIZU

Dobijene histološke pločice su uz pomoć digitalnog mikroskopa VisionTek® (*Sakura, Japan*) (slika 14g) skenirane pri uveličanju 100x i prevedene u digitalnu formu (slika 14d).

Dodatnom obradom u kompjuterskom program Adobe Photoshop CS6 (*Adobe Inc, Amerika*) svim jedinkama je dodeljen broj, kalibracija i determinisana površna zona (PZ), intermedijarna zona (IZ) i jukstamedularna zona (JMZ) bubrežne kore (slika 14f - g).

Površna zona predstavljen je subkapsularnim područjem bubrežne kore u debljini od tri prečnika prosečnog glomerula ($3 \times 60 = 180 \mu\text{m}$). Jukstamedularna zona bila je najdublja i obuhvatala je područje bubrežne kore koje se pružalo od medule do granice koju je činio nivo tri prečnika prosečnog glomerula ($3 \times 60 = 180 \mu\text{m}$) udaljenog od a. arcuatae. Intermedijarna zona se nalazila između dve pomenute zone (10).

Pažljivim posmatranjem za analizu su odabrani samo oni glomeruli kod kojih se mogao identifikovati vaskularni ili urinarni pol i u gore navedenom program dodeljen je broj glomerula pripadajuće analizirane zone (N).

3.3. MORFOMETRIJSKA ANALIZA

Upotrebom softverskog sistema Image Tool (IT) 3.0 (*UTHSCSA, Amerika*) i plugin-a area određena je površina ukupne kore (P_c) svake od analiziranih zona (P_{c-pz} , P_{c-iz} , P_{c-jmz}) i glomerula (P_g).

Na osnovu dobijenih vrednosti izračunata je:

- Numerička gustina glomerula (N_g) u sve tri ispitivane zone, a izražena u vrednosti: broj glomerula po mm^2

$$N_g = \frac{N(\text{broj glomerula})}{P(\text{površina})}$$

- Površinska frakcija glomerula unutar bubrežne kore (P_f) u sve tri ispitivane zone je izražena u %

$$P_f\% = \frac{100\%}{P_c} \times P_g$$

Upotrebom softverskog plugin-a distance određena je glavna (a) i sporedna (b) osa koje se seku pod pravim uglom i čine linearnu dužinu posmatranog preseka glomerula. Na osnovu dobijenih parametara glavne (a) i sporedne (b) ose izračunat je

- Profilni dijametar glomerula (d_g):

$$d_g = 2\sqrt{a \cdot b}$$

Pretpostavljajući da su glomeruli sferoidne strukture za izračunavanje

- Korigovanog srednjeg dijametra glomerula (\bar{D}_g) korišćena je Fullman-ova formula:

$$\bar{D}_g = \frac{\pi}{2} \times \frac{N}{\frac{1}{d_{g1}} + \frac{1}{d_{g2}} \dots \frac{1}{d_{gN}}}$$

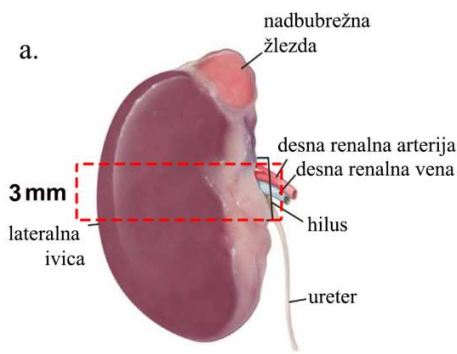
gde N predstavlja ukupan broj izmerenih glomerula.

Na osnovu vrednosti korigovanog srednjeg dijametra glomerula izračunata je

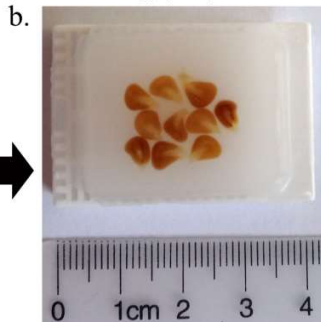
- Ukupna zapremina glomerula (V_g):

$$V_g = \frac{4\pi}{3} \times \left(\frac{\bar{D}_g}{2}\right)^3$$

disekcija tkivnog materijala

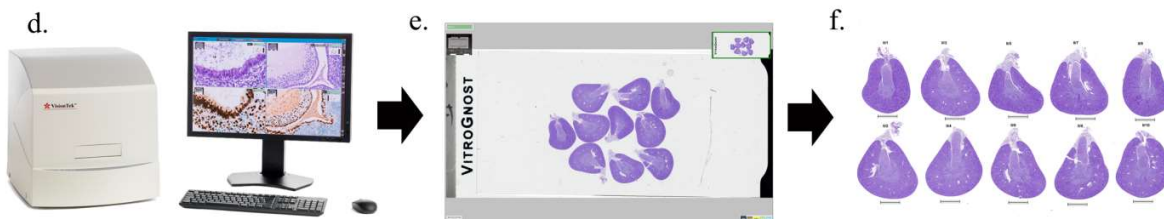


dehidracija i kalupljenje tkiva

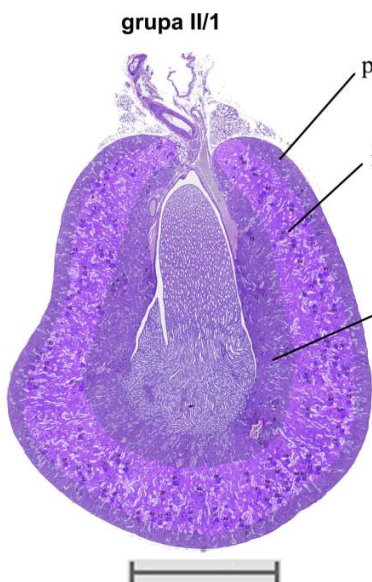


c. **histološko bojenje:**
hematoksilin i eozin
PAS bojenje

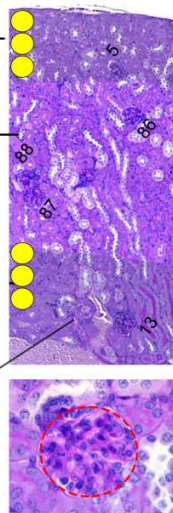
digitalizacija histoloških preseka i njihova priprema za morfometrijsku analizu



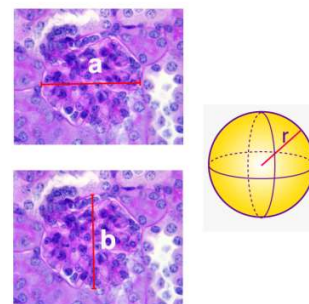
Morfometrijska analiza



g. određivanje površine bubrežne kore (zona) i glomerula



h. određivanje prečnika i volumena glomerula



$$d_n = \sqrt[3]{a \cdot b} \quad \bar{d}_n = d_n \times \frac{4}{\pi}$$

$$V_n = \frac{4\pi}{3} \times \left(\frac{\bar{D}_n}{2}\right)^3$$

Slika 14a - h. Priprema, obrada i analiza histološkog materijala

3.4. Laboratorijska analiza vrednosti kreatinina i cistatina C

Laboratorijska analiza koncentracije kreatinina i cistatina C je sprovedena u Zdravstvenoj ustanovi Medlab, Zavod za laboratorijsku dijagnostiku.

Kreatinin

Princip određivanja kreatinina je spektrofotometrijsko određivanje sa alkalnim pikratom, po Jaffe-ovoj modifikovanoj metodi. Pri alkalnom pH, kreatinin iz uzorka reaguje sa pikratom formirajući kompleks kreatinin-pikrat. Brzina povećanja absorbcije na 500 nm usled formiranja narandžasto obojenog kompleksa, direktno je proporcionalna koncentraciji kreatinina u uzorku.

Cistatin C

Princip određivanja cistatina C se zasniva na specifičnoj reakciji sa antitelima hvatačima i antitelima detektorima koji vezuju cistatin C iz uzorka. Ovaj kompleks (hvatajuće antitelo/analit/detektujuće antitelo) je imobilisan preko specifičnih anti-hvatač antitela kojim su obložene ELISA čašice. Za izvođenje ovog eseja, uzorci i standardi su dodati u čašice, a zatim i mešavina antitela. Nakon inkubacije, čašice su isprane da bi se uklonio nevezan materijal. TMB supstrat je dodat i tokom inkubacije katalizovan sa HRP enzimom, stvarajući plavo obojenje. Ova reakcija je zatim zaustavljena dodatkom Stop rastvora, zaustavljajući svaku dalju promenu boje, prevodeći je iz plave u žutu. Obojenje koje se dobija je proporcionalno količini vezanog analita i intenzitet boje je izmeren na 450 nm. Za konstruisanje standardne krive i preračunavanje rezultata korišćen je softver Curve Expert 1.4.

3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka je vršena pomoću programskih paketa: STATISTICA 12 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD) i SPSS program (Statistical Package for the Sociakl science - SPSS, Illinois, Chigaco, USA).

Numerička obeležja su prikazana putem srednjih vrednosti (aritmetička sredina, medijana) i mera varijabiliteta (opseg vrednosti, standardna devijacija), a atributivna obeležja korišćenjem frekvencija i procenata.

Komparacija vrednosti numeričkih obeležja između dve grupe vršena je primenom studentovog t-testa, odnosno neparametrijskog Mann-Whitney testa, dok za poređenje vrednosti između tri ili više grupa podataka je primenjena jednosmerna analiza varijanse (ANOVA).

Testiranje razlike frekvencija atributivnih obeležja je vršeno primenom χ^2 testa.

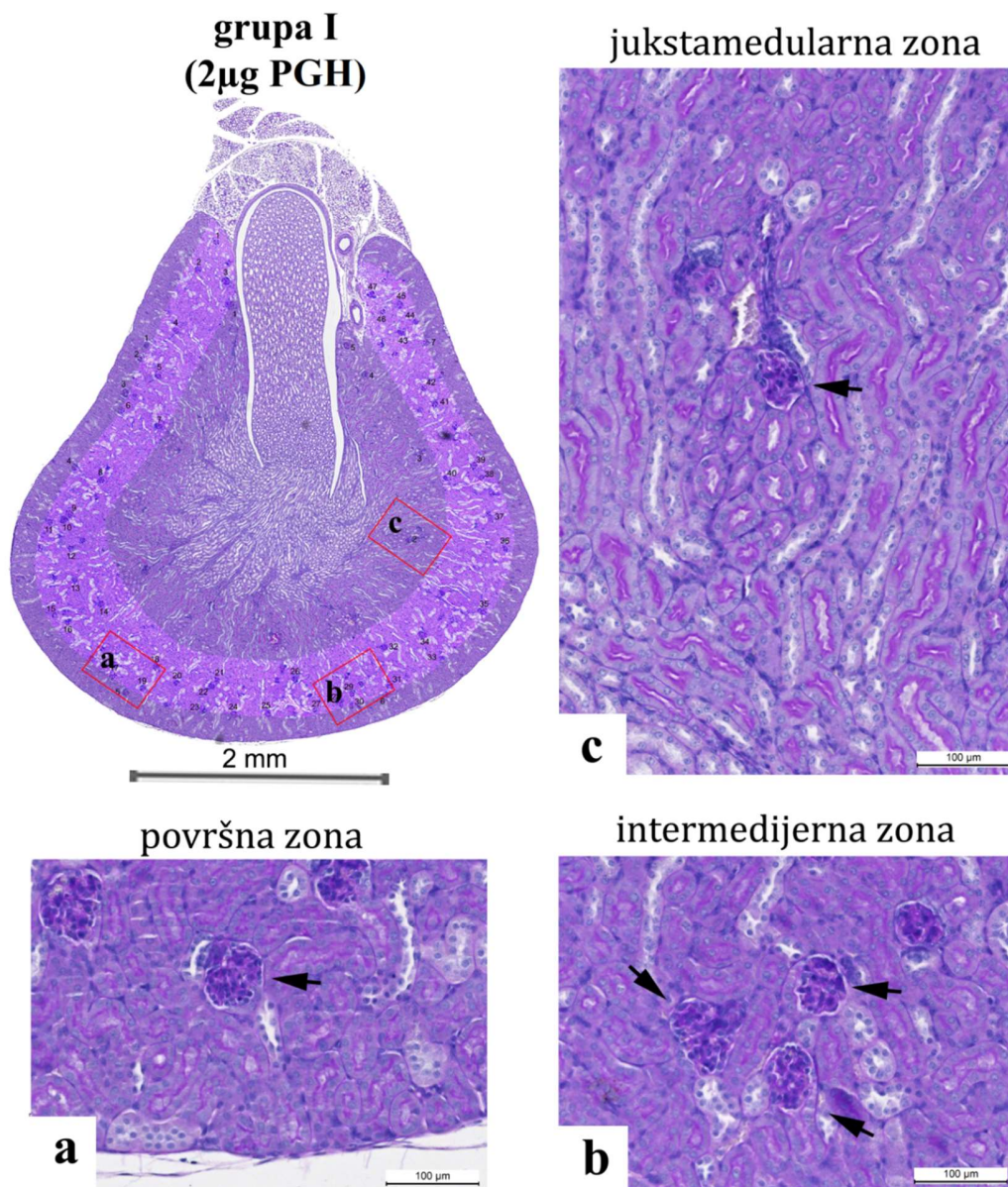
Ispitivanje povezanosti dva obeležja vršeno je primenom Pirson i Spriman koeficijent korelacije. U cilju ispitivanja dva ili vise obeležja, odnosno generisanja adekvatnih statističkih modela, korišćena je multivarijantna regresiona analiza.

Statistički značajnim su se smatrali vrednosti nivoa značajanosti $p < 0,05$.

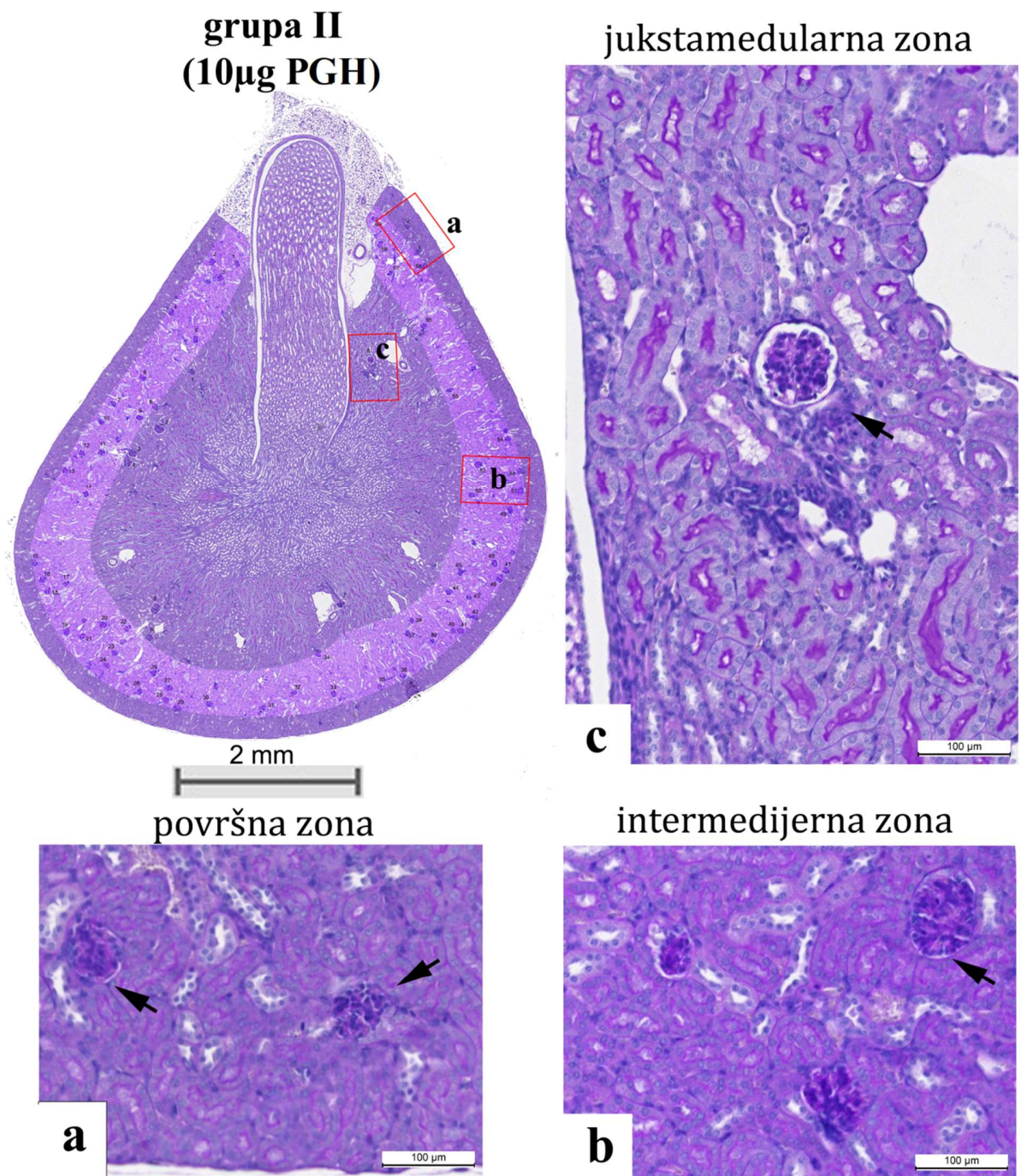
Rezultati su prikazani tekstualno, tabelarno i grafički.

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

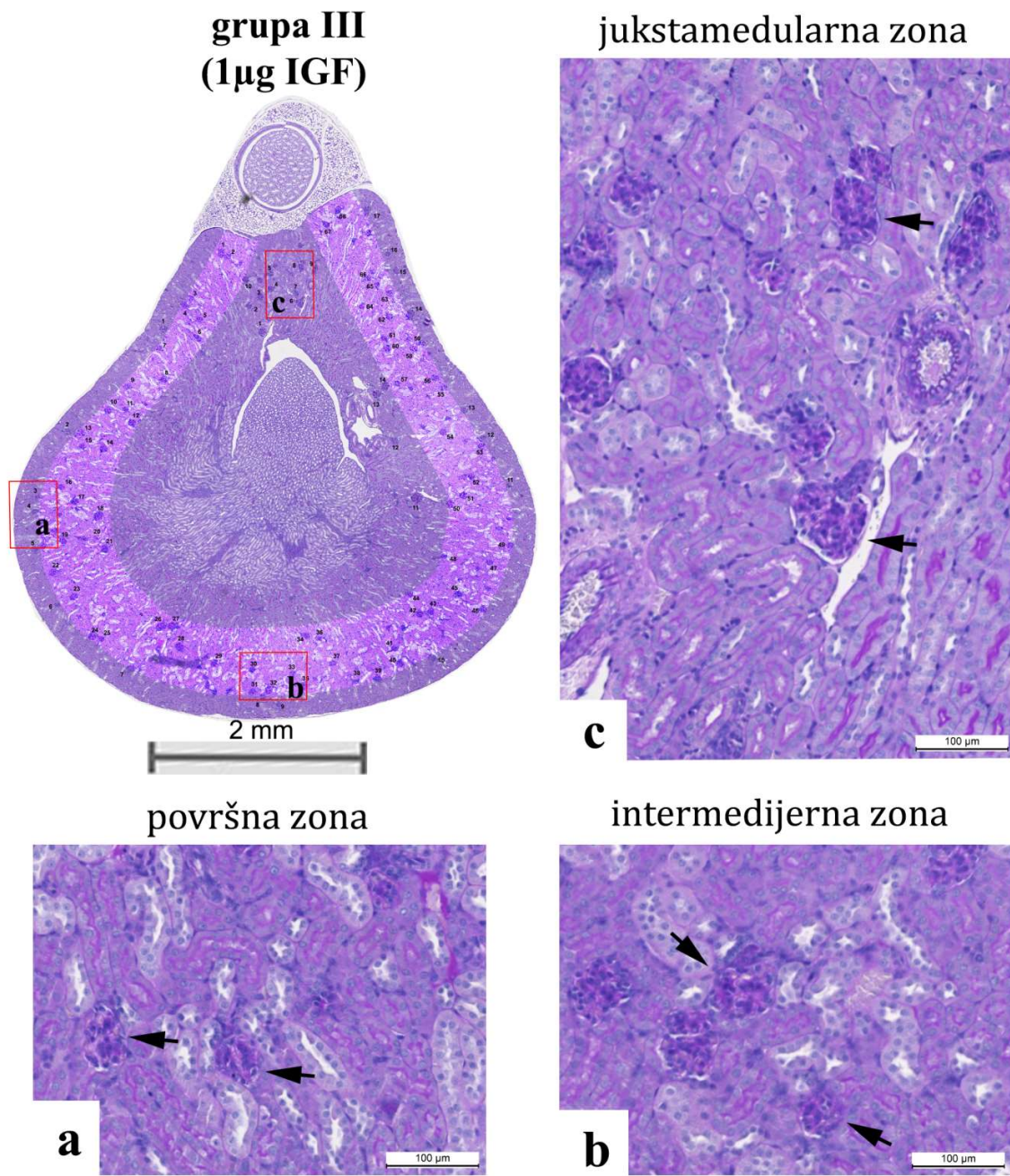
4.1. HISTOLOŠKI PRESEK GLOMERULA I MORFOMETRIJSKA ANALIZA PO GRUPAMA



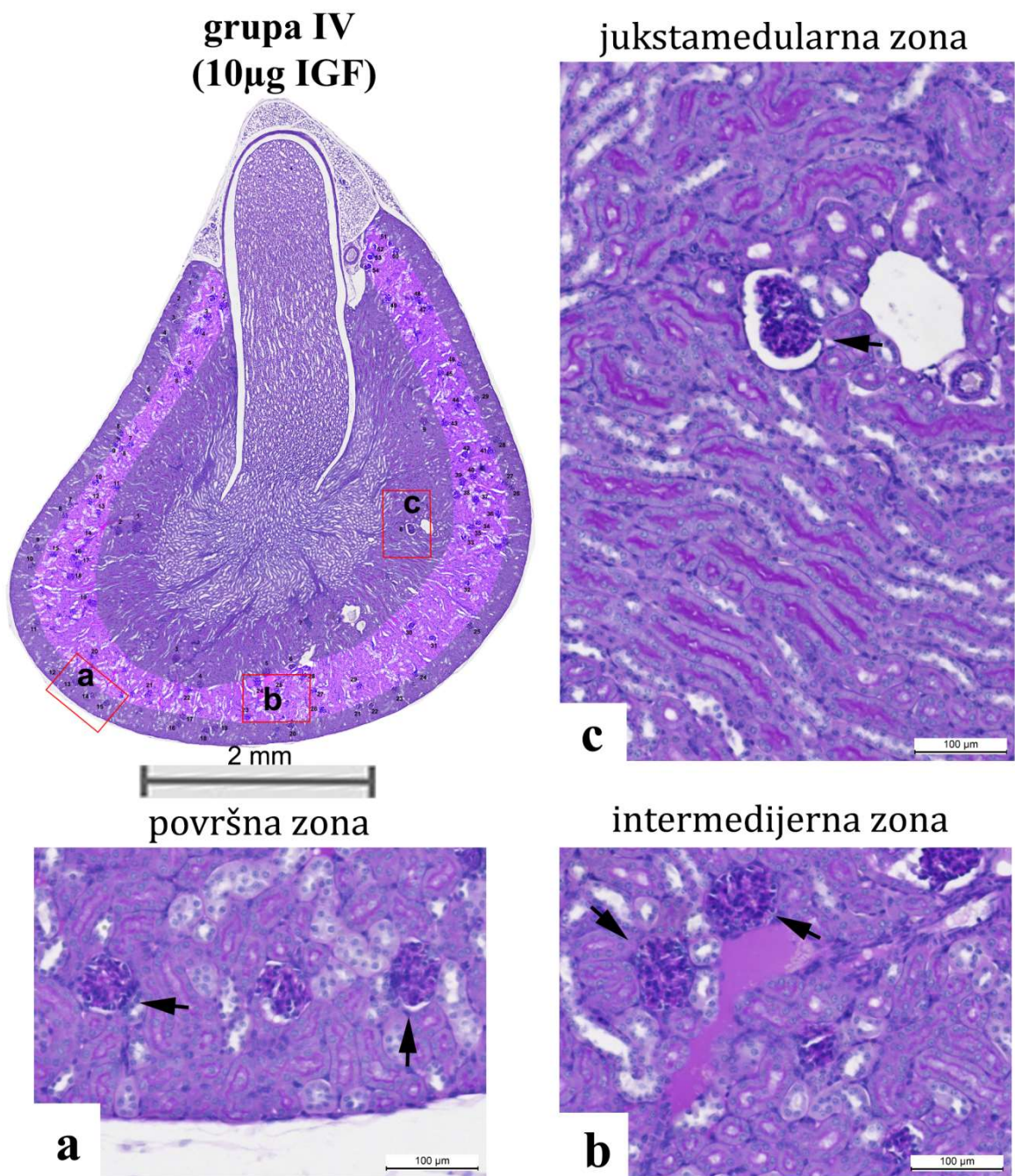
Slika broj 15. Glomeruli bubrega mladunaca miševa grupe I



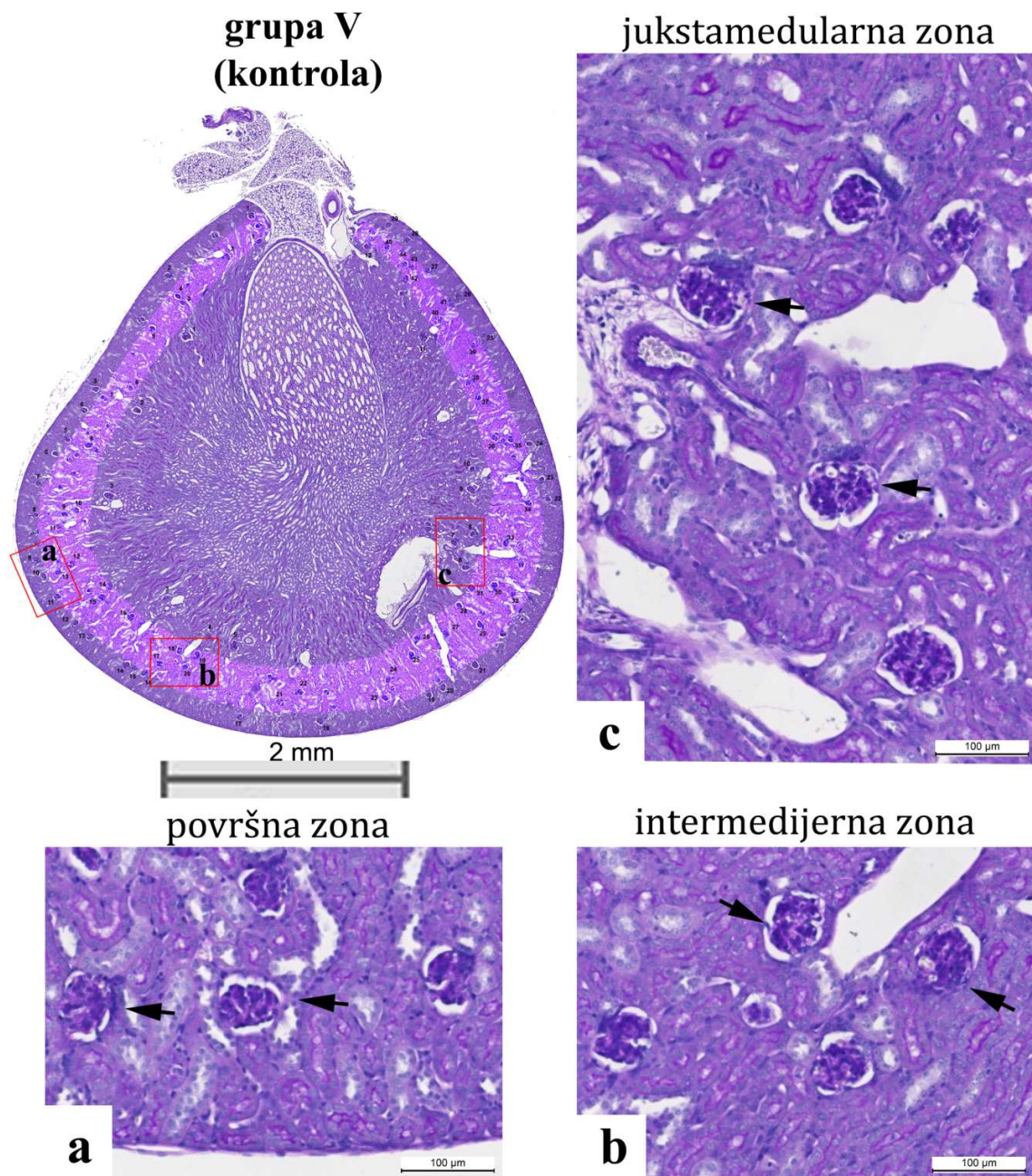
Slika broj 16. Glomeruli bubrega mladunaca miševa grupe II



Slika broj 17. Glomeruli bubrega mladunaca miševa grupe III

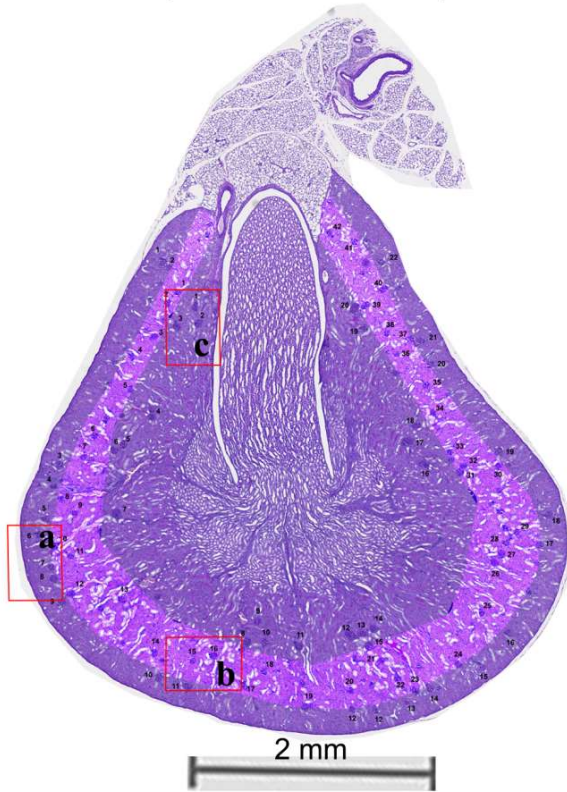


Slika broj 18. Glomeruli bubrega mladunaca miševa grupe IV

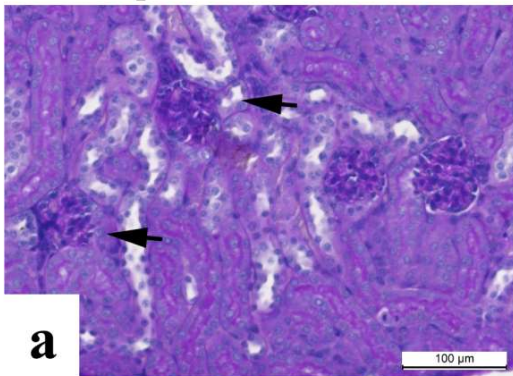


Slika broj 19. Glomeruli bubrega mladunaca miševa grupe V

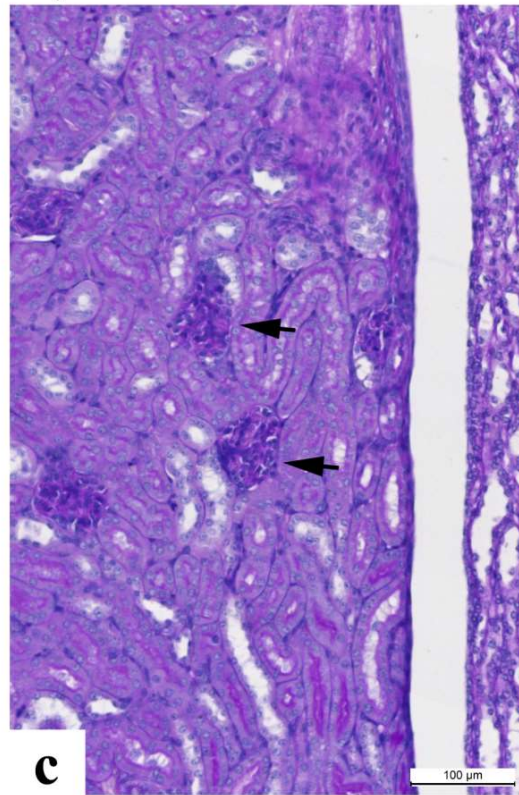
**grupa VI
(deksametazon)**



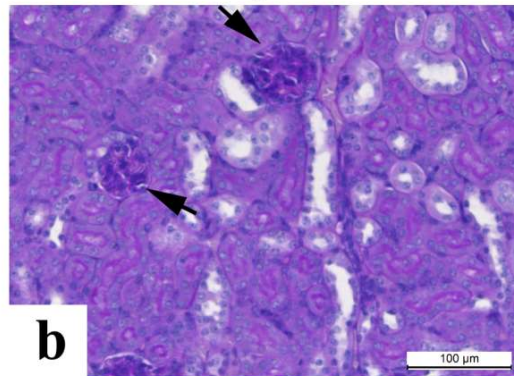
površna zona



jukstamedularna zona

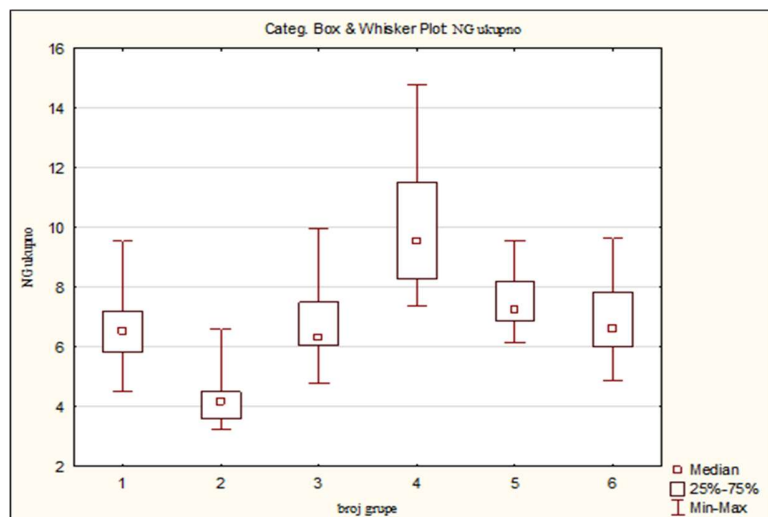


intermedijerna zona



Slika broj 20. Glomeruli bubrega mladunaca miševa grupe VI

4.2. ANALIZA NUMERIČKE GUSTINE (NG) GLOMERULA PO GRUPAMA UKUPNO I U TRI ISPITANA SLOJA KORE BUBREGA: POVRŠINSKA ZONA (PZ), INTERMEĐIJARNA ZONA (IMZ), JUKSTAMEDULARNA ZONA (JMZ)

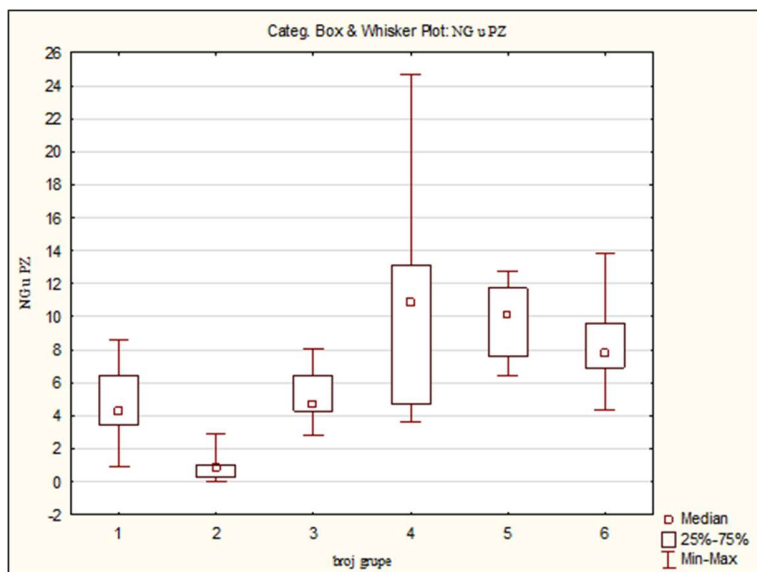


Grafikon 1. Poređenje numeričke gustine (NG) glomerula po grupama - ukupno
Na apscisi su prikazani brojevi grupa, a na ordinati NG izražena u broju glomerula/mm²

Multiple Comparisons p values (2-tailed); NG ukupno						
Independent (grouping) variable: broj grupe						
Kruskal-Wallis test: H (5, N= 57) =33.74741 p =.0000						
Depend.:	1	2	3	4	5	6
NG ukupno	R:26.333	R:7.2000	R:28.000	R:49.000	R:36.111	R:27.700
1		0.181689	1.000000	0.044358	1.000000	1.000000
2	0.181689		0.095757	0.000000	0.002251	0.086249
3	1.000000	0.095757		0.088412	1.000000	1.000000
4	0.044358	0.000000	0.088412		1.000000	0.061671
5	1.000000	0.002251	1.000000	1.000000		1.000000
6	1.000000	0.086249	1.000000	0.061671	1.000000	

Tabela 2. Poređenje numeričke gustine (NG) glomerula po grupama ukupno

Višestrukim poređenjem srednjih rangova ustanovljeno je da je numerička gustina glomerula grupe I značajno niža od numeričke gustine glomerula grupe IV ($p < 0,05$), kao i da je numerička gustina glomerula grupe II veoma značajno niža od numeričke gustine glomerula grupa IV i V ($p < 0,01$ u oba slučaja).

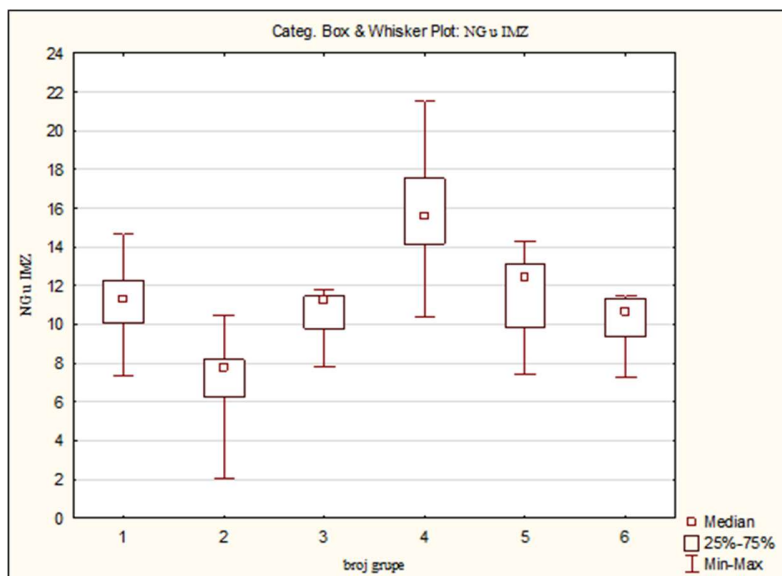


Grafikon 2. Poređenje numeričke gustine (NG) glomerula u površinskoj zoni (PZ) po grupama

Multiple Comparisons p values (2-tailed); NG u PZ						
Independent (grouping) variable: broj grupe						
Kruskal-Wallis test: H (5, N= 57) =34.70211 p =.0000						
Depend.:	1	2	3	4	5	6
NG u PZ	R:21.667	R:6.2000	R:25.444	R:40.900	R:42.222	R:37.800
1		0.638315	1.000000	0.175054	0.129178	0.515843
2	0.638315		0.174331	0.000044	0.000035	0.000311
3	1.000000	0.174331		0.640548	0.480166	1.000000
4	0.175054	0.000044	0.640548		1.000000	1.000000
5	0.129178	0.000035	0.480166	1.000000		1.000000
6	0.515843	0.000311	1.000000	1.000000	1.000000	

Tabela 3. Poređenje numeričke gustine (NG) glomerula u površinskoj zoni (PZ) po grupama

Višestrukim poređenjem srednjih rangova ustanovljeno je da je numerička gustina glomerula grupe II veoma značajno niža od numeričke gustine glomerula grupa IV, V i VI ($p < 0,01$ u sva tri slučaja).

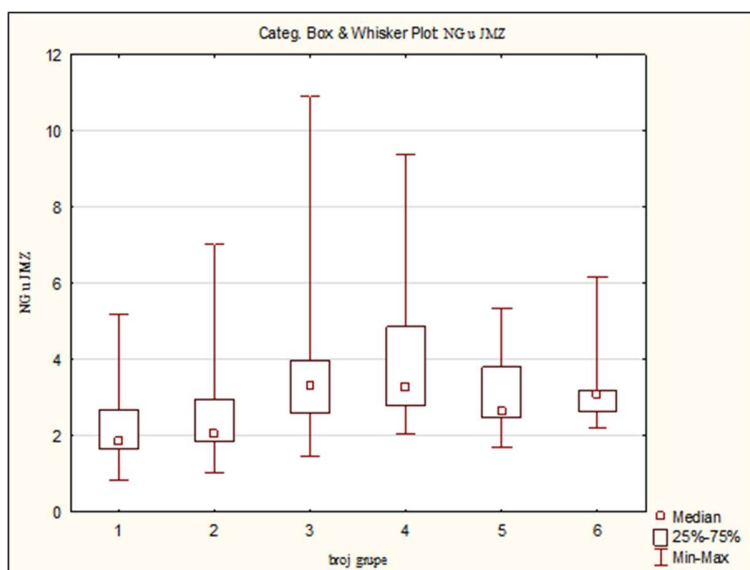


Grafikon 3. Poređenje numeričke gustine (NG) glomerula u intermedijarnoj zoni (IMZ) po grupama

Multiple Comparisons p values (2-tailed); NG u IMZ Independent (grouping) variable: broj grupe Kruskal-Wallis test: $H(5, N=57) = 30.91313$ $p = .0000$						
Depend.:	1	2	3	4	5	6
NG u IMZ	R:31.556	R:9.2000	R:26.778	R:49.300	R:33.222	R:24.400
1		0.050622	1.000000	0.299694	1.000000	1.000000
2	0.050622		0.317603	0.000001	0.024499	0.608831
3	1.000000	0.317603		0.047173	1.000000	1.000000
4	0.299694	0.000001	0.047173		0.525219	0.011928
5	1.000000	0.024499	1.000000	0.525219		1.000000
6	1.000000	0.608831	1.000000	0.011928	1.000000	

Tabela 4. Poređenje numeričke gustine (NG) glomerula u intermedijarnoj zoni (IMZ) po grupama

Višestrukim poređenjem srednjih rangova ustanovljeno je da je numerička gustina glomerula grupe IV značajno veća od numeričke gustine glomerula grupa III i VI ($p < 0,05$) i veoma značajno veća od numeričke gustine glomerula grupe II ($p < 0,01$). Takođe, numerička gustina glomerula grupe II je značajno manja od numeričke gustine glomerula grupe V ($p < 0,05$).



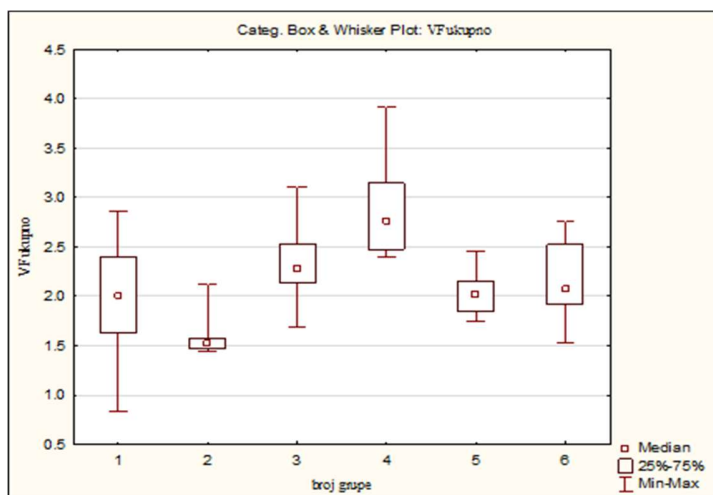
Grafikon 4. Poređenje numeričke gustine (NG) glomerula u jukstamedularnoj zoni (JMZ) po grupama

Multiple Comparisons p values (2-tailed); NG u JMZ Independent (grouping) variable: broj grupe Kruskal-Wallis test: $H(5, N=57) = 11.48982$ $p = .0425$						
Depend.:	1	2	3	4	5	6
NG u JMZ	R:18.000	R:20.000	R:33.000	R:37.900	R:29.778	R:34.700
1		1.000000	0.828446	0.136061	1.000000	0.428105
2	1.000000		1.000000	0.238342	1.000000	0.714966
3	0.828446	1.000000		1.000000	1.000000	1.000000
4	0.136061	0.238342	1.000000		1.000000	1.000000
5	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000		1.000000
6	0.428105	0.714966	1.000000	1.000000	1.000000	

Tabela 5. Poređenje numeričke gustine (NG) glomerula u jukstamedularnoj zoni (JMZ) po grupama

Višestrukim poređenjem srednjih rangova ustanovljeno je da razlike između pojedinačnih parova grupa nisu statistički značajne ($p > 0,05$).

4.3. ANALIZA VOLUMENSKE FRAKCIJE (VF) GLOMERULA PO GRUPAMA UKUPNO I U TRI ISPITANA SLOJA KORE BUBREGA: POVRŠINSKA ZONA (PZ), INTERMEDIJARNA ZONA (IMZ), JUKSTAMEDULARNA ZONA (JMZ)

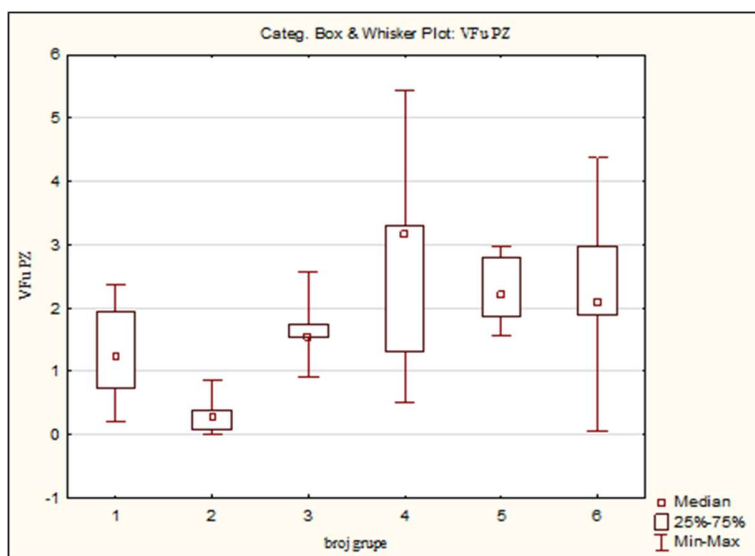


Grafikon 5. Poređenje volumenske frakcije (VF) glomerula po grupama ukupno
Na apscisi su prikazani brojevi grupa, a na ordinati VF izražena u procentima (%)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); VF ukupno Independent (grouping) variable: broj grupe Kruskal-Wallis test: H (5, N= 57) =30.89288 p =.0000						
Depend.:	1	2	3	4	5	6
VF ukupno	R:24.889	R:8.9000	R:34.556	R:48.900	R:26.333	R:30.300
1		0.540523	1.000000	0.024621	1.000000	1.000000
2	0.540523		0.011520	0.000001	0.333870	0.059094
3	1.000000	0.011520		0.899768	1.000000	1.000000
4	0.024621	0.000001	0.899768		0.046290	0.183290
5	1.000000	0.333870	1.000000	0.046290		1.000000
6	1.000000	0.059094	1.000000	0.183290	1.000000	

Tabela 6. Poređenje volumenske frakcije (VF) glomerula po grupama ukupno

Višestrukim poređenjem srednjih rangova ustanovljeno je da je volumenska frakcija grupe II značajno niža od volumenske frakcije grupe III ($p < 0,05$) i veoma značajno niža od volumenske frakcije grupe IV ($p < 0,01$), kao i da je volumenska frakcija grupe IV značajno viša od volumenske frakcije grupa I i V ($p < 0,05$ u oba slučaja).

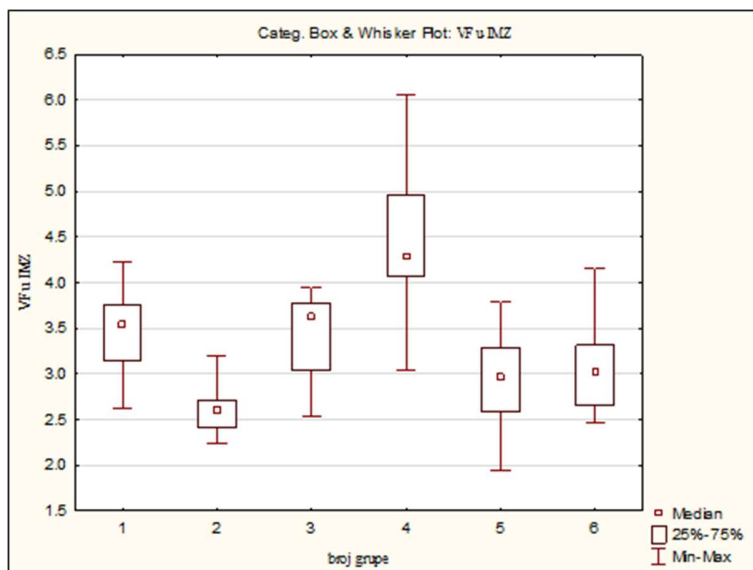


Grafikon 6. Poređenje volumenske frakcije glomerula u površinskoj zoni (PZ) po grupama

Multiple Comparisons p values (2-tailed); VF u PZ Independent (grouping) variable: broj grupe Kruskal-Wallis test: $H(5, N=57) = 27.88338$ $p = .0000$						
Depend.: VF u PZ	1	2	3	4	5	6
	R:23.111	R:7.7000	R:27.111	R:40.300	R:38.333	R:37.600
1		0.649549	1.000000	0.363053	0.775785	0.861797
2	0.649549		0.163789	0.000169	0.000885	0.000844
3	1.000000	0.163789		1.000000	1.000000	1.000000
4	0.363053	0.000169	1.000000		1.000000	1.000000
5	0.775785	0.000885	1.000000	1.000000		1.000000
6	0.861797	0.000844	1.000000	1.000000	1.000000	

Tabela 7. Poređenje volumenske frakcije glomerula u površinskoj zoni (PZ) po grupama

Višestrukim poređenjem srednjih rangova ustanovljeno je da je volumenska frakcija grupe II veoma značajno niža od volumenske frakcije grupa IV, V i VI ($p < 0,01$ u sva tri slučaja).

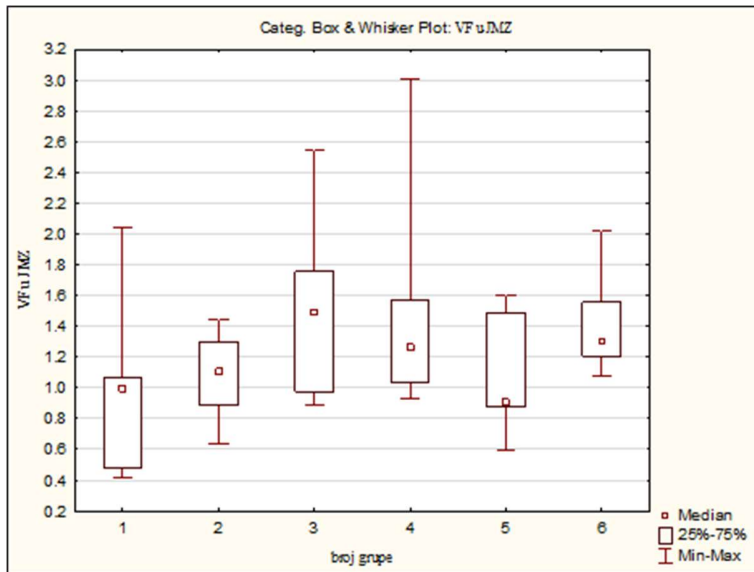


Grafikon 7. Poređenje volumenske frakcije glomerula u intermedijarnoj zoni (IMZ) po grupama

Multiple Comparisons p values (2-tailed); VF u IMZ Independent (grouping) variable: broj grupe Kruskal-Wallis test: H (5, N= 57) =28.39161 p =.0000						
Depend.:	1	2	3	4	5	6
VF u IMZ	R:34.556	R:11.500	R:32.889	R:48.400	R:22.667	R:24.300
1		0.037524	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000
2	0.037524		0.075567	0.000010	1.000000	1.000000
3	1.000000	0.075567		0.629447	1.000000	1.000000
4	1.000000	0.000010	0.629447		0.011102	0.017513
5	1.000000	1.000000	1.000000	0.011102		1.000000
6	1.000000	1.000000	1.000000	0.017513	1.000000	

Tabela 8. Poređenje volumenske frakcije glomerula u intermedijarnoj zoni (IMZ) po grupama

Višestrukim poređenjem srednjih rangova ustanovljeno je da je volumenska frakcija grupe II značajno niža od volumenske frakcije grupe I ($p < 0,05$) i veoma značajno niža od volumenske frakcije grupe IV ($p < 0,01$), kao i da je volumenska frakcija grupe IV značajno viša od volumenske frakcije grupa V i VI ($p < 0,05$ u oba slučaja).



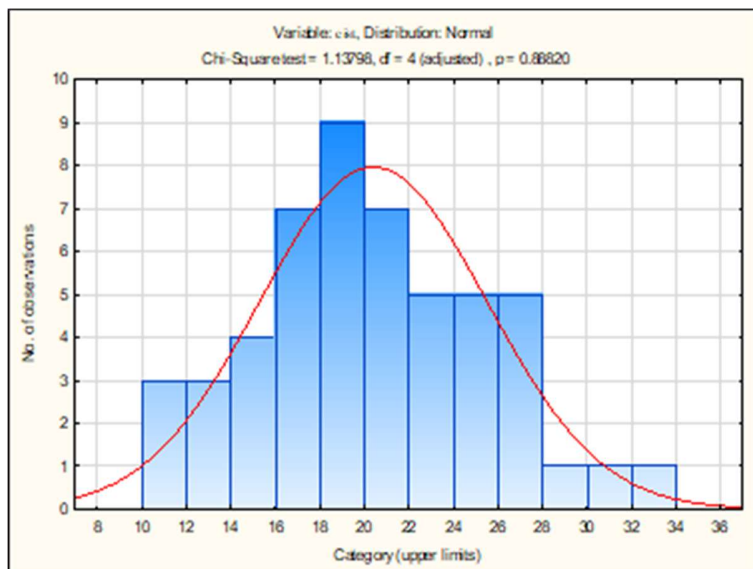
Grafikon 8. Poređenje volumenske frakcije glomerula u jukstamedularnoj (JMZ) po grupama

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; VF u JMZ				
Independent (grouping) variable: broj grupe				
Kruskal-Wallis test: $H(5, N=57) = 10.80395$ $p = .0554$				
Depend.:	Code	Valid N	Sum of Ranks	Mean Rank
VF u JMZ				
1	1	9	176.0000	19.55556
2	2	10	236.0000	23.60000
3	3	9	325.0000	36.11111
4	4	10	346.0000	34.60000
5	5	9	198.0000	22.00000
6	6	10	372.0000	37.20000

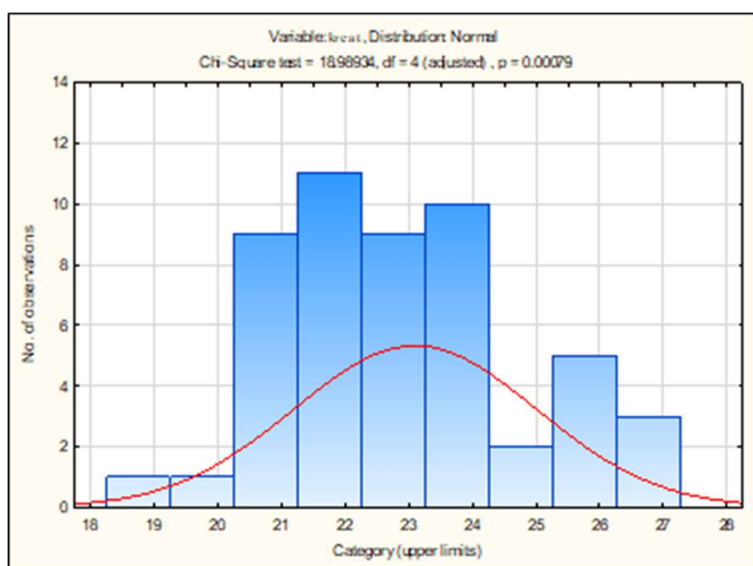
Tabela 9. Poređenje volumenske frakcije glomerula u jukstamedularnoj zoni (JMZ) po grupama

Poređenjem volumenske frakcije glomerula Kruskal Wallis ANOVA pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika u volumenskoj frakciji glomerula u JMZ između posmatranih grupa ($p > 0,05$).

4.4. ANALIZA VREDNOSTI CISTATINA C I KREATININA



Grafikon 9. Distribucija frekvencija i saglasnost sa normalnom raspodelom cistatina C



Grafikon 10. Distribucija frekvencija i saglasnost sa normalnom raspodelom kreatinina

Distribucija cistatina C je saglasna sa normalnom raspodelom (hi-kvadrat test = 1.137, $p=0.888$).

Distribucija kreatinina nije saglasna sa normalnom raspodelom (hi-kvadrat test = 18.989, $p=0.001$)

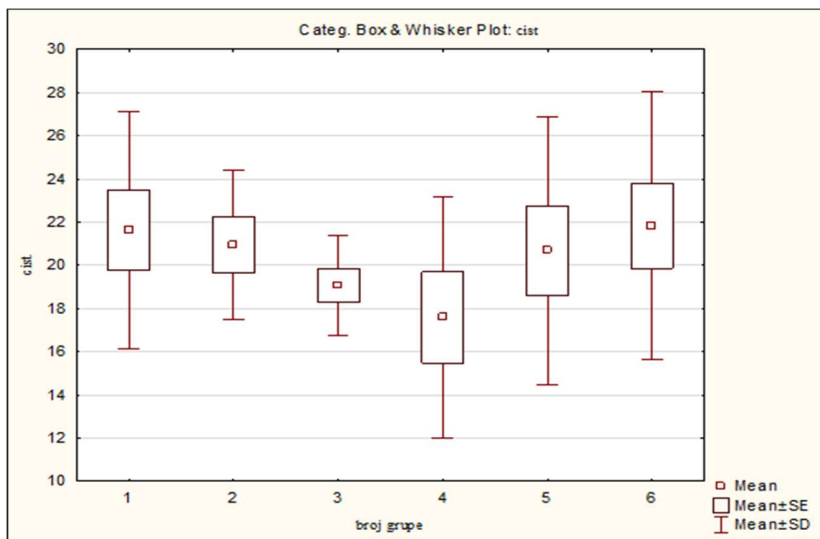
4.3.1. Korelacija između nalaza vrednosti cistatina C i kreatinina

	N	Spearman koef. korelacije	t-statistika	p- vrednost
Cistatin C i kreatinin	51	-0.219029	-1.57136	0.122535

Tabela 10. Korelacija između nalaza vrednosti cistatina C i kreatinina

Korelirani su parovi vrednosti cistatina C i kreatinina (51 par). Na uzorku nije utvrđena statistički značajna korelacija između vrednosti cistatina C i kreatinina, što znači da se ne može zaključiti na osnovu jednog parametra kakvo je ponašanje drugog (ako jedan raste, drugi može i da raste i da opada) - nisu u značajnoj korelaciji.

4.3.2. Poređenje vrednosti cistatina C po grupama



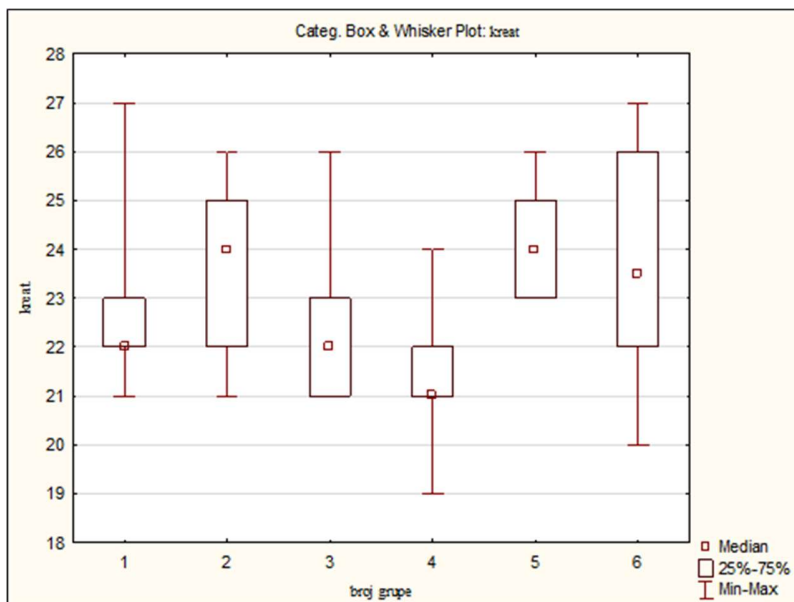
Grafikon 11. Poređenje vrednosti cistatina C po grupama. Na apscisi su brojevi grupa, a na ordinati vrednost cistatina C izražena u mmol/l.

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; cist Independent (grouping) variable: broj grupe Kruskal-Wallis test: H (5, N= 51) =3.537011 p =.6178				
Depend.: cist	Code	Valid N	Sum of Ranks	Mean Rank
1	1	9	259.5000	28.83333
2	2	7	202.0000	28.85714
3	3	9	201.5000	22.38889
4	4	7	129.5000	18.50000
5	5	9	236.0000	26.22222
6	6	10	297.5000	29.75000

Tabela 11. Poređenje vrednosti cistatina C po grupama.

Neparametarska KW ANOVA je potvrdila rezultate jednosmerne ANOVA-e, tj.pokazala da nema statistički značajne razlike u vrednosti cistatina C između 6 grupa (H-statistika=3.537, p=0.618).

4.3.3. Poređenje vrednosti kreatinina po grupama



Grafikon 12. Poređenje vrednosti kreatinina po grupama. Na apscici su brojevi grupa, a na ordinati vrednost kreatinina izarežena u $\mu\text{mol/l}$

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; kreat				
Independent (grouping) variable: broj grupe				
Kruskal-Wallis test: H (5, N= 51) =14.22128 p =.0143				
Depend.: kreat	Code	Valid N	Sum of Ranks	Mean Rank
1	1	9	205.5000	22.83333
2	2	7	222.0000	31.71429
3	3	9	172.0000	19.11111
4	4	7	92.5000	13.21429
5	5	9	325.0000	36.11111
6	6	10	309.0000	30.90000

Tabela 12. Poređenje vrednosti kreatinina po grupama

Multiple Comparisons p values (2-tailed); kreat						
Independent (grouping) variable: broj grupe						
Kruskal-Wallis test: H (5, N= 51) =14.22128 p =.0143						
Depend.: kreat	1	2	3	4	5	6
	R:22.833	R:31.714	R:19.111	R:13.214	R:36.111	R:30.900
1		1.000000	1.000000	1.000000	0.872025	1.000000
2	1.000000		1.000000	0.298568	1.000000	1.000000
3	1.000000	1.000000		1.000000	0.229106	1.000000
4	1.000000	0.298568	1.000000		0.033618	0.236627
5	0.872025	1.000000	0.229106	0.033618		1.000000
6	1.000000	1.000000	1.000000	0.236627	1.000000	

Tabela 13. Poređenje vrednosti kreatinina po grupama

Kruskal-Wallis ANOVA po rangovima je pokazala da postoji statistički značajna razlika u vrednosti kreatinina između VI grupa (H-statistika=14.221, p=0.014).

Višestrukim upoređivanjem srednjih rangova svih VI grupa je utvrđeno da se značajna razlika javlja između IV i V grupe (p=0.033), dok između ostalih parova grupa nema statistički značajne razlike (p>0.05). Kreatinin je u grupi IV najniži.

5. DISKUSIJA

Kardiovaskularne bolesti su jedan od vodećih uzroka mortaliteta u razvijenim zemljama sa 4,3 miliona smrtnih ishoda godišnje u zemljama Evropske unije. Hipertenziju ima preko 70% stanovništva starije od 60 godina koja pogošava ishemijsku bolest srca, gojaznost i dijabetes tip 2, a predstavlja i važan faktor rizika za nastanak hronične bubrežne insuficijencije. Tokom poslednje tri decenije stvoren je koncept razvojnog programiranja hroničnih bolesti odraslih (razvojno poreklo zdravlja i bolesti), čiji patofiziološki i molekularni mehanizmi su višestruki i delimično razjašnjeni, a smanjeni broj nefrona igra odlučujuću ulogu u tome. Redukovani broj nefrona je odgovoran za adaptivnu glomerularnu hiperfiltraciju, konsektivnu glomerularnu hipertenziju, proteinuriju, oštećenje glomerularne stope filtracije i sistemsku hipertenziju. Smanjen broj nefrona predstavlja „faktor ranjivosti“, koji uz dodatne faktore kao što su ubrzani rast u prvim godinama života i prekomerna ishrana, indukuje rani početak nekih bubrežnih bolesti, napr. IgA nefropatije, hroničnog pijelonefritisa ili nefrotskog sindroma (215).

Tokom svog *in utero* razvoja bubreg može biti pogođen promenama u intrauterusnom okruženju koje dovode do oštećenja nefrogeneze. Nefrogeneza se završava između 32. i 36. gestacijske nedelje i od tog momenta broj nefrona je određen za ceo život, tj. novi nefroni se u najvećem broju slučajeva ne stvaraju nakon tog perioda. Izuzetak mogu da budu prevremeno rođena novorođenčad kod kojih i nakon rođenja nefrogeneza može da bude nastavljena stvaranjem novih imaturnih glomerula. Ultrazvučni pregledi novorođenčadi male porođajne mase (ispod 2500g) su ukazali da oni imaju tanje bubrege normalne dužine što je sugerisalo i na postojanje manjeg broja nefrona (216). Kod ovakvog bubrega da bi se nadoknadila oštećena funkcija dolazi do kompenzatorne hipertrofije koja se javlja između 3. i 24. meseca života LBW novorođenčadi (217). Takođe, u sklopu traganja za etiologijom hronične bubrežne bolesti kod dece, utvrđeno je da postoji veća stopa prematuriteta i IUGR kod ove dece, bez obzira da li je bubrežna insuficijencija kongenitalna, hereditarna ili stečena (218).

Kod dece sa IUGR porast u telesnoj masi nakon rođenja može nekada biti toliko izražen da u potpunosti kompenzuje *in utero* zastoje u rastu i oni uglavnom dostižu genetski predodređen rast,

odnosno imaju nadoknadu rasta (tzv. "catch-up"). Utvrđeno je da oko 30% dece dostiže adekvatan rast u periodu između rođenja i druge godine života. Kod ove grupe dece registrovana je povećana koncentracija leptina u pupčaniku, veća visina oca i povećan unos hrane. Deca koja imaju "catch-up" rasta do druge godine života, u uzrastu od pet godina imaju veću telesnu masu, veći indeks telesne mase i viša su u odnosu na drugu decu (219).

Stereološka ispitivanja bubrega prilikom obdukcija su pokazala da je kod ljudi koji su rođeni u terminu broj nefrona proporcionalan porođajnoj masi. Iz tog razloga se porođajna masa pojavila kao prvi klinički znak ekvivalentan broju nefrona. Usporen intrauterusni razvoj može dovesti do deficita nefrona u vidu permanentno oštećenog strukturalnog nasleđa.

Ustanovljeno je da novorođenčad male telesne mase ne samo da imaju manje bubrege na rođenju, već i loš apsolutan i relativan (u odnosu na telesnu masu) rast bubrega od rođenja do 18. meseca života. Još uvek nije poznato da li je neadekvatan postnatalni rast bubrega odraz sekundarnog gubitka postojećih nefrona ili nemogućnost usklađivanja njihove hipertrofije sa telesnim rastom (220).

U svom radu *Manalich* je opisao smanjen broj glomerula kod novorođenčadi sa telesnom masom ispod 2500g na rođenju, koja su unutar dve nedelje od rođenja preminula od oboljenja koja nisu bila povezana sa oštećenjem bubrega. Dokazana je snažna korelacija između broja glomerula (direktna) i veličine glomerula (obrnuta) sa telesnom masom na rođenju, tj. mali broj glomerula može biti rizik za nastanak i progresiju bubrežnih oboljenja (221).

Prevremeni porođaj se dešava za vreme trajanje nefrogeneze koja se dokazano nastavlja i nakon prevremenog porođaja. Patohistološki nalazi isečaka bubrega prevremeno rođene novorođenčadi su jasno pokazali aktivne nefrogene zone sa evidentnim razvojem imaturnih glomerula. Korišćenjem stereoloških tehnika došlo se do zaključka da je ukupan broj nefrona povećan nakon rođenja čak i do normalnih vrednosti, iako su mnogi od njih bili abnormalne strukture, cistično izmenjeni sa proširenim Boumanovim prostorom, često atubularni, lokalizovani u površinskoj zoni kore bubrega, u najvećoj meri afunkcionalni. Razlog zašto su bubrezi nekih prematurusa više, a neki manje pogođeni, leži najverovatnije u stepenu i kvalitetu intenzivne nege nakon rođenja. Zanimljivo je da je veličina bubrega kod prevremeno rođene novorođenčadi neproporcionalno velika u odnosu na celo telo (222). Kod humanog IUGR, nastalog usled

niskoproteinske dijete majke tokom trudnoće, dolazi do prekomerne ekspozicije fetusa glukokortikoidima majke usled smanjene aktivnosti placentalne tip2 11- β hidroksteroide dehidrogenaze (11 β -HSD2) koja ima zadatak da inhibiše transplacentarni prenos majčinog kortikosterona. Svi ovi rezultati ističu potrebu za dugoročnim praćenjem novorođenčadi koja su prenatalno bila izložena glukokortikoidimama majke (preteći prevremeni porođaj, bolesti vezivnog tkiva majke, rizik za rađanje novorođenčeta sa kongenitalnom adrenalnom hiperplazijom). Davanje kortikosteroida trudnicama, pogotovo u kumulativnim dozama može pogoditi fetalni rast i dovesti do IUGR. Kod ljudi, u zavisnosti od toga kada je došlo do gubitka nefrona, njihov smanjen broj ne mora uvek, po pravilu da dovede do hipertenzije, ali je bitno naglasiti da poremećaji u broju nefrona neposredno pre i kratko posle rođenja mogu imati štetne konsekvence za funkciju bubrega i krvni pritisak (223). Jedan od prvih pokazatelja oštećenja funkcije bubrega i razvoja bubrežne insuficijencije je mikroalbuminurija koja prethodi smanjenju stope glomerularne filtracije. Kao što je već rečeno, veliki broj radova je publikovao podatke koji čvrsto sugerišu vezu između telesne mase na rođenju sa veličinom bubrega, brojem nefrona, glomerularnim volumenom, albuminurijom i sistolnim krvnim pritiskom. U populaciji australijskih Aboridžina i Pima Indijanaca siromaštvo i loši uslovi života dovode do male telesne mase novorođenčadi, a metabolički sindrom i bubrežna insuficijencija u odrasloj dobi dostižu epidemijske razmere (224). U istoj populaciji Hoy i saradnici su nakon obdukcije umrlih, ustanovili da je broj nefrona obrnuto srazmeran volumenu glomerula, što sugeriše da je glomerulomegalija marker povećanog rizika za razvoj progresivne bubrežne bolesti (225). Najveći broj eksperimentalnih studija se radi na životinjama, te su dugoročna praćenja krvnog pritiska, renalne funkcije i strukture bubrega na humanoj populaciji veoma malo istražena.

Veliki broj studija na životinjama je ukazao na smanjenu funkciju bubrega nakon IUGR. Najčešće se eksperimenti izvode na pacovima, iako oni nisu najbolji model za ispitivanje humane nefrogeneze jer kod njih nefrogeneza počinje oko 12. dana i ne završava se sve do 8. postnatalnog dana. To znači da je na samom rođenju prisutno manje od 20% ukupnog broja nefrona. Kada se unilateralna nefrektomija izvrši u fetalnom ili ranom neonatalnom periodu tj. za vreme aktivne nefrogeneze dokumentovana je hipertenzija kod odraslih jedinki što stvara vezu između malog broja nefrona i povišenog krvnog pritiska. Velika kompleksnost procesa nefrogeneze dovodi u sumnju tumačenje da je snižen broj nefrona, sam po sebi dovoljan da

dovede do bubrežnih oboljenja i hipertenzije. Ne sme se zanemariti i *in utero* okruženje koje može da dovede do strukturnih i funkcionalnih oštećenja i ima uticaj na funkciju bubrega. Tu spadaju: suprimirana aktivnost sistema renin-angiotenzin-aldosteron, prekomerna koncentracija kortikosteroida, izmenjen tubularni transport Na, K i Cl, aberantna i neodogovarajuća aktivnost ostalih vazoaktivnih sistema.

Merlet-Bénichou je na pacovima indukovao IUGR potomstva ligaturom a. uterine ili niskoproteinskom dijetom majke. Ukupan broj nefrona unutar celog bubrega na rođenju i dve nedelje nakon rođenja je signifikantno korelirao sa telesnom masom. Bez obzira na kompenzatorno povećanje broja nefrona dve nedelje od rođenja, kod životinja rođenih sa deficitom nefrona od oko 30%, bubrežna funkcija je bila oštećena (226).

U drugoj studiji na animalnom IUGR modelu kod pacova ukazano je da se masa fetalnog mozga i srca povećavaju recipročno sa povećanjem mase tela, pri čemu relativna masa bubrega ostaje nepromenjena. IUGR ženke pacova su imale hipertrofiju levog srca, povišen krvni pritisak i smanjenu stopu glomerularne filtracije zasnovanu na merenju vrednosti kreatinina i uree (227).

Kod gravidnih ženki pacova, niskoproteinska dijeta i davanje sintetičkih glukokortikoida, na prvom mestu deksametazona i betametazona se široko koristi u cilju imitiranja uslova nastanka IUGR u humanim trudnoćama.

U sprovedenom eksperimentu je korišćen IUGR animalni model indukovani glukokortikoidima. Trudnim ženkama miševa je supkutano aplikovan deksametazon u dozi od 100 μ g/kg/na dan tokom sedam dana, od 15 - 21. dana gestacije. Miševi kod kojih je eksperimentom izazvan IUGR su imali manji broj glomerula u odnosu na kontrolnu grupu (27.700 vs 36.111).

Lucas sa kolegama je u svom eksperimentu trudnim ženkama pacova limitirao ishranu za 50%, u prvoj ili drugoj polovini trudnoće kao i tokom celog trajanja iste. Rezultati su ukazali na oštećenje renalne funkcije njihovog potomstva nakon tri meseca od rođenja. Morfometrijska ispitivanja su pokazala da je broj glomerula bio signifikantno snižen, kako kod mladunaca na rođenju, tako i kod odraslih jedinki, bez obzira u kom periodu trudnoće je ishrana bila limitirana. Dijametar glomerula je imao signifikantan porast u svakoj studijskoj grupi što je karakteristično zbog kompenzatorne hipertrofije preostalih nefrona. Ova zapažanja su dovela do hipoteze da intrauterusna malnutricija može biti determinanta ranog ispoljavanja glomeruloskleroze kod

odraslih jedinki. S tim u vezi, može se napraviti korelacija sa nedonesenim babunima kod kojih je broj nefrona po gramu bubrežnog tkiva značajno smanjen u odnosu na babune rođene u terminu (83.840 vs 193.400). Ovakvi nalazi nagoveštavaju da postoji glomerularna hipertrofija za koju se zna da je povezana sa bubrežnom patologijom i povećana tubularna masa unutar bubrežne kore bubrega preterminskih babuna.

Histološka evaluacija bubrega kod pacova uzrasta 18 meseci koji su bili izloženi intrauterusnoj malnutriciji je pokazala učestalost glomeruloskleroze i tubulointersticijalnih lezija sa visokom ekspresijom nivoa fibronektina, desmina i L-aktina u glomerulima, Boumanovoj kapsuli i intersticijumu. Sva ova zapažanja navode da promene koje nastaju u bubrezima vremenom i s godinama se mogu dodatno pogoršati kod IUGR modela zbog renalnih strukturnih promena koje se kod njih dešavaju u ranom životu (228).

Ovakvi ishodi su potkrepljeni i od strane *Mesquita* koji je histološki potvrdio hipertrofiju glomerula i uvećanje podocita kod IUGR potomstva pacova najverovatnije usled morfoloških promena tokom adaptacije na smanjen broj nefrona (229).

Iako se broj nefrona ne povećava nakon rođenja, u slučaju povećanih telesnih zahteva za filtracijom povećava se veličina glomerula do hipertrofije. Srednji glomerularni volumen obrnuto je srazmeran broju glomerula i direktno srazmeran veličini tela. Registrovano je povećanje srednjeg glomerularnog volumena za 133% uz istovremeno smanjenje broja glomerula za 46% kod belaca sa primarnom hipertenzijom u odnosu na kontrolnu grupu (230).

Volumen bubrega se može meriti i ultrazvukom, ali to ima pozitivnu prediktivnu vrednost samo u slučaju malog volumena. Nedavno su objavljeni radovi na polju transplantacije bubrega koji se bave procenom broja nefrona kod zdravih davalaca koristeći kombinaciju glomerularne filtracije, veličine bubrega i podataka dobijenih biopsijom.

U nedostatku adekvatne tehnike za praćenje i merenje broja nefrona *in vivo*, rane faze hronične bubrežne insuficijencije često ostaju dugo neprepoznate i na taj način je onemogućena rana intervencija koja bi zaustavila napredovanje bolesti.

Baldelomar sa kolegama je 2018. godine prvi put uspeo tehnički da izvede direktno, *in vivo* merenje broja i volumena glomerula kod pacova. Koristili su magnetnu rezonancu (MRI) i contrast - katjonizovani feritin (CFE-MRI) koji su u kombinaciji sa prilagođenim hardverskim i softverskim dizajnom pružili priliku da se istraže mehanizmi progresije bubrežne bolesti i terapijski odgovor tokom vremena (231).

Ubrzan transport natrijuma u hiperfiltracionom nefronu ili aktivacija simpatičkog sistema su dva verovatna mehanizma prema kojima mali broj nefrona može da dovede do hipertenzije. Međutim, mali broj nefrona može da bude praćen i primarnim strukturnim promenama glomerula, tubulointercijuma i krvnih sudova koje mogu doprineti promeni intrarenalnog i/ili sistemskog pritiska. Ove strukturne promene bubrega mogu varirati u zavisnosti od toga da li je uzrok smanjenog broja nefrona genetski faktor ili je nastao pod uticajem okoline. Kod ispitivanja bubrežnih promena u mišjem genetski uslovljenom IUGR modelu sa 30% manje nefrona po bubregu, otkrivene su rane promene ultrastrukture glomerula, tj. zadebljanje bazalne membrane glomerula i gubitak podocita, bez dokaza o oštećenjima tubulointercijuma ili vaskularnog prostora. Suprotno tome, kod bubrega IUGR pacova, usled niskoproteinske ishrane majke primećen je značajan porast tubulointercijumske upale i oštećenja u poređenju sa kontrolnom grupom pacova, što jasno ukazuje da se efekti malog broja nefrona kod prenatalnog programiranja moraju posmatrati različito u zavisnosti od genetskih faktora i faktora okoline.

Do danas nije pronađen ni jedan biohemijski marker koji bi bio u vezi sa smanjenjem bubrežne zapremine i IUGR-om.

Koncentracija kreatinina u plazmi je povećana na rođenju i pada postepeno kako se povećava glomerularna filtracija u prvoj nedelji života. Bitno je istaći da serumski kreatinin u prvoj nedelji života pokazuje veliku varijabilnost: najviše koncentracije na samom rođenju ima kod novorođenčadi rođene u terminu, dok kod onih koji su rođeni <32 gestacijske nedelje postizanje vršne koncentracije je odloženo do trećeg dana života uz postepeno smanjenje iste. Poznavanje ovog obrazca ključno je za istraživanje korisnosti serumskog kreatinina kao biomarkera akutne bubrežne insuficijencije (232).

Redukcija broja nefrona u odsustvu kompenzatorne hiperfunkcije dovodi do smanjenja totalne stope glomerularne filtracije i klirensa kreatinina, te kod novorođenčadi u prvom danu života, koja su rođena pre termina ili sa malom telesnom masom, stopa glomerularne filtracije je oštećenja u porođenju sa onom koju imaju novorođenčad normalne telesne mase. Niža stopa glomerularne filtracije i viši nivo serumskog kreatinina su utvrđeni kod LBW dece u uzrastu od 6-12 godina, u poređenju sa kontrolnom grupom dece koja su imala normalnu porođajnu masu (233). Takođe, nađena je pozitivna korelacija između porođajne mase i jačine glomerularne filtracije zasnovane na merenju koncentracije kreatinina kod mladih odraslih osoba, rođenih pre

vremena (234). Veliki broj studija se bavio određivanjem koncentracije kreatinina kod dece koja su imala malu porođajnu masu i sve su imale isti zaključak: klirens kreatinina i stopa glomerularne filtracije su bili signifikantno niži kod dece rođene sa malom telesnom masom (235). U velikoj studiji koja je sprovedena kod 7457 norvežana uzrasta od 20-30 godina koji su na rođenju bili IUGR (podaci dobijeni iz registra živorođenih), na osnovu klirensa kreatinina došlo se do zaključka da je IUGR značajno povezan sa sniženom funkcijom bubrega i to više kod osoba muškog pola (236).

Cistatin C je sekretorni neglikozilirani protein koji se proizvodi konstantnom brzinom u svim nukleotidnim ćelijama. Zahvaljujući maloj molekularnoj masi od 13kDa slobodno se filtrira u glomerulima bubrega bez povraćaja u cirkulaciju, zbog čega je klinički utvrđeni biomarker za brzinu glomerularne filtracije. U proksimalnim tubulima se pretežno reapsorbuje u krvotok, te je njegova koncentracija u urinu niska; visoke koncentracije cistatina C u urinu su znak abnormalne reapsorpcije i degradacije u tubulima bubrega.

U najnovijoj studiji japanskih naučnika opisan je prvi slučaj procenjene stope glomerularne filtracije jednog nefrona (Single-nephron estimated glomerular filtration rate - SN-eGFR) kod 23-godišnje žene koja je imala perzistentnu proteinuriju sa smanjenom renalnom funkcijom procenjenom na osnovu glomerularne filtracije cistatina C, a rođena je u 24. gestacijskoj nedelji sa porođajnom težinom 704g. Renalnom biopsijom je ustanovljena fokalna segmentna glomeruloskleroza sa povećanim dijametrom glomerula. Na osnovu izračunate SN-eGFR koja je bila viša u odnosu na vrednosti dobijene kod zdravih bubrežnih donora iste starosne grupe, došlo se do zaključka da je glomerularna hiperfiltracija patofiziološki uzrok fokalne glomerularne skleroze što pruža važan uvid u patofiziološki mehanizam nastanka bubrežnih oboljenja LBW (237).

Ispitivana je veza između povišenih koncentracija cistatina C i manjeg volumena bubrega kod IUGR novorođenčadi koja nisu bili prematurusi (gestacijska starost >36 nedelja) i dokazano da IUGR novorođenčad imaju statistički signifikantno povišene vrednosti cistatina C i smanjeni renalni volumen, što sugeriše da bi se cistatin C mogao uzeti kao zamena za masu nefrona. Kao što je prethodno diskutovano, smanjen broja nefrona je sam po sebi nedovoljan da bi doveo do hipertenzije i bubrežnih oboljenja, tako da bi određivanje cistatina C u kombinaciji sa renalnim volumenom moglo biti korisno za identifikovanje IUGR neonatusa koji su u visokom riziku za

razvoj hroničnih bubrežnih oboljenja i za selektovanje onih pacijenata koji zahtevaju dalji monitoring tokom detinjstva (238).

Kwinta i saradnici su istraživali dugoročne bubrežne sekvele kod dece prosečnog uzrasta 6-7 godina koja su rođena kao LBW novorođenčad između 2002-2004. godine, u poređenju sa terminskom novorođenčadi istog uzrasta. U grupi koja je obuhvatila LBW decu određivan je serumski cistatin C, albuminurija, 24h holter krvnog pritiska i ultrazvuk bubrega. Došlo se do zaključka da su serumski cistatin C i volumen bubrega signifikantno izmenjeni kod dece rođene sa niskom porođajnom masom u odnosu na kontrolnu grupu, te su potrebna dugoročna praćenja ovih pacijenata u cilju sprečavanja nastanka bubrežnih sekvela (222,239).

Slični rezultati su dobijeni i u studiji u kojoj je ispitivana funkcija bubrega na osnovu koncentracije cistatina C, kreatinina i uree, a ultrazvukom je merena veličina bubrega kod 64 ekstremno prevremeno rođena novorođenčeta u uzrastu od 7 i 11 godina. Ustanovljeno je značajno smanjenje volumena bubrega u oba uzrasta i povišene vrednosti cistatina C i uree u uzrastu od 11 godina, u poređenju sa kontrolnom grupom dece istog uzrasta koja su rođena u terminu (240). Studije pokazuju da je najviši nivo serumskog cistatina C uglavnom u grupama ispitanika koji su na rođenju imali telesnu masu ispod 2500g i da je cistatin C bolji marker glomerularne filtracije kod prematurusa ispod 1500g (241).

Međutim, bez obzira što se sve više ističe da noviji markeri glomerularne funkcije su od velikog kliničkog značaja, (od kojih su najistaknutiji cistatin C, Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin - NGAL i Kidney Injury Molecule 1 – KIM 1), kreatinin za sada ipak ostaje jedan od najznačajnijih markera za procenu brzine glomerularne filtracije (242).

Trenutna literatura ostaje nedosledna te su potrebna dalja istraživanja kako bi se pravilno identifikovali i standardizovali osetljivi i specifični urinarni biomarkeri za bolju procenu funkcije bubrega u nedonoščadi (243).

U sprovedenom eksperimentu koncentracija cistatina C je slična u svim ispitivanim grupama.

Koncentracija kreatinina je najniža u grupi gde je data veća doza IGF1 (10 μ g), što znači da je IGF1 imao pozitivan efekat na bubrežnu funkciju IUGR miševa. Studije koje su se bavile ispitivanjem bubrežne funkcije kod dece rođene sa malom porođajnom masom su dokazale da je klirens kreatinina signifikantno niži kod te dece. IGF1 10 μ g je povećao i gustinu i volumen

glomerula više nego kod IUGR-a bez terapijske intervencije, te je bubrežna funkcija kod ovih miševa, žrtvovanih u adultnom periodu, bolja nego kod miševa iz drugih ispitivanih grupa.

U studiji *Boubred* i kolega na animalnom modelu pacova, kod kojih je IUGR potomstva indukovano ordiniranjem glukokortikoida majci u gestaciji koja korespondira sa ranom nefrogenezom, uočen je izražen deficit nefrona na rođenju, ali za razliku od većine drugih studija, bez značajne glomerularne hipertrofije, što može biti rezultat difuzne glomerularne skleroze povezane sa ishemijom. Ono što su istraživači u ovoj studiji sugerisali je pretpostavka da deficit nefrona, sam po sebi nije dovoljan da indukuje bolest, ali što je broj nefrona manji, bez obzira na porođajnu težinu, to je mogućnost za nastanak oboljenja veća. Deficit nefrona je predložen kao faktor ranjivosti, ali uz druge postnatalne faktore rizika, kao što su prekomerna ishrana, ubrzan rast, visok unos soli (244).

Placentalni hormon rasta se luči u slojevima sinciciotrofoblasta i ekstraviloznog citotrofoblasta ljudske posteljice. Njegove koncentracije se povećavaju tokom trudnoće, a može se detektovati i u amniotskoj tečnosti i krvi pupčanika. Utiče na razvoj posteljice i rast fetusa tako što podstiče glikoneogenezu, lipolizu i anabolizam u organima majke i povećava dostupnost hranljivih materija direktno ili preko IGF1. Potrebno je još dosta kliničkih studija koje bi potvrdile značaj PGH kao biomarkera za niz abnormalnih stanja u trudnoći, uključujući i zaostajanje u fetalnom rastu. Rezultati su još uvek kontroverzni i nedovoljni za objašnjenje mehanizma delovanja PGH, ali nedvosmisleno ukazuju na njegov značaj u regulaciji rasta i razvoja placente, fetusa i ishoda trudnoće (165).

Do sada sprovedene studije su otkrile nizak nivo majčinog PGH i humanog horionskog somatomotropnog hormona (chorionic somatomotrophic hormone - CSH) u trudnoćama komplikovanim hipertenzijom, preeklampsijom i intrauterinom restrikcijom rasta. RT-PCR metodom je ispitivana veza između ekspresije PGH i CSH i porođajne težine terminskih novorođenčadi. Nalazi su ukazali na novine: polovina PGH transkripta otkrivenih u placentama nakon terminskih porođaja kodira nepoznate, alternativne proteine čije funkcije nisu još poznate, ali zaslužuju dalje ispitivanje. Jedna od hipoteza predlaže da polimorfna ili epigenetska regulacija ekspresije PGH može da promeni ekspresiju drugih hormona ili faktora rasta kao što su insulin i IGF1, promeni distribuciju i dostupnost hranljivih materija za majku i/ili direktno

utiče na replikaciju i rast fetalnih tkiva. Pošto je PGH antagonista insulina i moćan lipolitični hormon koji stimuliše proizvodnju IGF1 tokom trudnoće, očekuje se da će smanjenje ekspresije PGH smanjiti lipolizu i nivoe IGF1 u cirkulaciji, što bi moglo da smanji težinu fetusa smanjenjem dostupnosti hranljivih materija majci i ograničavanjem transfera hranljivih materija kroz placentu. Ova hipoteza je problematična jer smanjenje lipolize, uzrokovano nedostatkom PGH treba biti praćeno povećanjem majčinih zaliha masti, pri čemu mnoge žene koje rađaju IUGR novorođenčad imaju nizak indeks telesne mase. Alternativna hipoteza utemeljena je na ideji da smanjenje ekspresije PGH predstavlja odgovor na metaboličke ili genetske poremećaje koji menjaju uteroplacentalnu funkciju poput hipertenzije, sistemskog eritematoznog lupusa ili generalizovanog poremećaja razvoja posteljice. Dodatno, pad PGH može biti i posledica pothranjenosti majke: smanjena težina majke u trudnoći bi u teoriji povećala osetljivost majke na insulin i adiponektin u plazmi, koji smanjuje nivo PGH u ćelijama trofoblata, in vitro. Pad u koncentraciji PGH mogao bi ograničiti majčinu lipolizu, čime bi se delimično kompenzovalo smanjenje majčinih zaliha masti. Oba mehanizma mogu objasniti smanjenje PGH i pad majčinog IGF1 u trudnoćama povezanim sa zaostajanjem u rastu fetusa. Konačni dokazi koji podržavaju ove hipoteze trenutno nedostaju. Mnogi su doveli u pitanje uloge CSH i PGH u ljudskoj fiziologiji trudnoće jer su neke žene s delecijama gena CSH i/ili PGH imale normalne trudnoće i rađale decu normalne porođajne težine. Ovi nalazi sugerišu da ni CSH ni PGH, sami po sebi nisu potrebni za normalnu trudnoću, ali je moguće da drugi hormoni, kao što su hipofizni hormon rasta ili prolaktin mogu nadoknaditi odsutnost PGH ili CSH. Broj objavljenih slučajeva (n = 11) delecija CSH i PGH pokazao je promenljivo zaostajanje fetalnog rasta, što ukazuje na prisutnost drugih činioca koji mogu održati trudnoću i razvoj fetusa u odsutnosti CSH i/ili PGH (245).

S obzirom na efekat PGH na rast fetusa i invaziju trofoblata, nekoliko studija je istraživalo odnos između koncentracije majčinog serumskog PGH i intrauterine restrikcije rasta. Otkrivene su konstantno niže koncentracije PGH kod LBW novorođenčadi (246).

U sprovedenoj studiji, miševi koji su dobili manju dozu (2 μ g) PGH i veću dozu (10 μ g) PGH, kada su žrtvovani u adultnom periodu generalno su imali manji broj glomerula i manji volumen u odnosu na sve ostale grupe. Davanje 10 μ g PGH je dovelo do smanjenog broja glomerula u površinskoj i intermedijarnoj zoni sa statistički značajnom razlikom ($p < 0,05$) u odnosu na grupu koja je dobila 10 μ g IGF1 i kontrolnu grupu bez intervencije, kao i do smanjenja volumena

glomerula sa statistički značajnom razlikom ($p < 0,05$) u odnosu na grupu koja je dobila $10\mu\text{g}$ IGF1. To može ukazivati da PGH ima inhibitorno dejstvo na razvoj glomerula. U dostupnoj literaturi nema podataka o ovakvim istraživanjima te su potrebna dalja ispitivanja da bi se dobili relevantni podaci o patofiziološkom dejstvu PGH.

IGF1 reguliše ćelijski ciklus, proliferaciju i diferencijaciju. Kontroliše transportni kapacitet posteljice i posreduje u stimulativnom dejstvu insulina i hormona štitaste žlezde. Tokom trudnoće lučenje IGF1 je stimulirano od strane placentalnog hormona rasta. Neosetljivost na hormon rasta, kako kod ljudi tako i kod transgenih miševa, ima za posledicu blagu intrauterusnu restrikciju rasta na rođenju, dok nedostatak IGF1 tokom trudnoće je povezan sa ozbiljnom intrauterusnom restrikcijom rasta, što je utvrđeno kako kod ljudi tako i na eksperimentima kod transgenih životinjskih modela usled delecije gena IGF1. Životinje sa nedostatkom IGF1 su neurološki oštećene, pri čemu se stvorio zaključak da je normalna koncentracija IGF1 neophodna za pravilan razvoj mozga fetusa tokom trudnoće. IGF1 pojačava sintezu proteina i sprečava proteolizu, odnosno ima ključnu ulogu u regulaciji rasta fetusa (247). Studije su otkrile prisustvo IGF1 iRNK u svim ćelijama bubrega miševa od 15. embrionalnog dana, sa drastičnim smanjenjem nakon rođenja.

Normalna funkcija bubrega uključuje glomerularnu filtraciju, tubularnu sekreciju i reapsorpciju što dovodi do normalnog balansa tečnosti i elektrolita čime bubrezi imaju kontrolu nad krvnim pritiskom kao i sintezom hormona kao što su eritropoetin i vitamin D.

Dokazi o direktnom dejstvu IGF1 na funkciju glomerula potiču od pacijenata koji su zbog mutacija hormona rasta neosetljivi na njegovo dejstvo. Aplikovanje IGF1 kako glodarima tako i ljudima povećava stopu glomerularne filtracije i renalne perfuzije, utiče na protok krvi povećanjem koeficijenta ultrafiltracije i smanjenjem otpornosti u eferentnoj arterioli. Dokazano je da IGF1 stimuliše rast i povećava mišićnu masu nakon rođenja kod životinja. Na eksperimentu sa intraplacentalnim aplikovanjem IGF1 genske terapije se došlo se do zaključka da njegovo davanje može poboljšati porođajnu težinu kod IUGR animalnog modela na zečevima (248).

Fiziološki značaj IGF1 je opsežno proučavan posebno kod transgenih miševa. Hiperekspresija IGF1 kod transgenih miševa indukuje glomerularnu hipertrofiju, a njegov deficit dovodi do smanjenja veličine bubrega, glomerula kao i broja nefrona, što sugeriše da IGF1 igra značajnu ulogu tokom razvoja bubrega (249).

Prevenција za nastanak hronične bolesti bubrega se zasniva na efikasnom i promptnom lečenju hipertenzije. Razumevanje poremećaja GH-IGF-IGFBP osovine u hroničnoj bolesti bubrega dalo je mogućnost za razvoj novih terapijskih strategija kod hronične bolesti bubrega. Nekoliko studija je pokazalo da davanje IGF1 poboljšava renalnu funkciju, povećava veličinu bubrega i odlaže vreme započinjanja dijalize. Zna se da je značajno povećanje IGFBP kako u tkivu bubrega, tako i u plazmi i urinu, jedna od najčešćih karakteristika glomeruloskleroze, tubulointersticijalne fibroze i hiperplazije medije zidova krvnih sudova bubrega kod hipertenzivne nefroskleroze. *Matejka* i kolege su u svojoj studiji aplikovali veću dozu IGF1 - 50 μ g u parenhim bubrega što je dovelo do rasta bubrega kroz proces ćelijske hipertrofije i hiperplazije, naglog ubrzanja protoka krvi kroz bubrege i povećanja glomerularne filtracije, uz smanjenje renalne vaskularne rezistencije (250).

U sprovedenom eksperimentu dobijeni rezultati su ukazali da je u grupi miševa koji su dobili 10 μ g IGF1 bio povećan i broj i volumen glomerula u odnosu na ostale grupe. Čak i kod miševa koji su dobili manju dozu (1 μ g) IGF1 nije dokazan ovakav efekat na glomerule.

Mali uzorak i kratko vreme trajanja studije su glavni nedostaci sprovedenog ispitivanja.

Veće i dugoročne studije i na životinjskim modelima i na humanoj populaciji bi bile potrebne da bi se utvrdilo da li će u starosti, glomeruloskleroza i posledična hronična bubrežna insuficijencija pre nastupiti kod IUGR potomaka koji nakon rođenja nisu dobili IGF1 u odnosu na one koji su dobili IGF1, tj. da li aplikovanje IGF1 nakon rođenja IUGR potomcima ima preventivno dejstvo i može duže da očuva funkciju njihovih bubrega.

Hipertenzija i hronična bubrežna insuficijencija imaju značajan uticaj na globalni morbiditet i mortalitet. Radna grupa "*The Low Birth Weight and Nephron Number Working Group*" sastavljena iz eminentnih međunarodnih stručnjaka iz oblasti neonatologije, nefrologije i akušerstva je 2016. godine donela konsenzus koji je imao za cilj da se bavi zanemarenim problemom razvojnog programiranja bolesti sa posebnim fokusom na hipertenziju i bolesti bubrega. Naglašena je potreba da se deluje rano da bi se sprečio razvoj hroničnog oštećenja bubrega i drugih nezaraznih bolesti adultnog doba, kroz smanjenje broja prevremenih porođaja i novorođenčadi rođenih sa malom telesnom masom i malim brojem nefrona. Konsenzus je donet

u cilju definisanja strategija koje bi limitirale ili potpuno prekinule ciklus razvojnog programiranja oštećenja bubrega, što je pogotovo bitno u najsiromašnijim delovima sveta. Rutinskim upisivanjem porođajne mase i gestacijske starosti u zdravstveni karton svakog pacijenta bi markiralo one koji su u riziku za smanjeni broj nefrona. To bi značilo redovno praćenje krvnog pritiska, optimizovanje ishrane i indeksa telesne mase, skrining na mikroalbuminuriju i poremećaj glomerularne filtracije kod tih pojedinaca, te adekvatan pristup i lečenje svakog od njih (251).

Razumevanje koliko loš intrauterusni rast dovodi do lošeg ranog postnatalnog rasta bubrega može otkriti neočekivane terapijske mogućnosti.

6. ZAKLJUČAK

1. Veća doza - 10 μ g PGH smanjuje numeričku gustinu glomerula.
2. Veća doza - 10 μ g PGH smanjuje volumensku frakciju glomerula.
3. Veća doza - 10 μ g IGF1 povećava numeričku gustinu glomerula.
4. Veća doza - 10 μ g IGF1 povećava volumensku frakciju glomerula.
5. Koncentracija cistatina C je slična u svim ispitivanim grupama.
6. Koncentracija kreatinina je značajno niža u grupi miševa koji su dobilo 10 μ g IGF1 u odnosu na ostale grupe.

7. LITERATURA

1. Horster MF, Braun GS, Huber SM. Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis and cell differentiation. *Physiol Rev.*1999;79(4):1157-91.
2. Saxen L, Sariola H. Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol.*1987;1(3):385-92.
3. Rosenblum S, Pal A, Reidy K. Renal development in the fetus and premature infant. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2017;22(2):58-66.
4. Milin J. *Embriologija*, Novi Sad, STYLOS – Izdavaštvo, 2000.
5. Kreidberg JA. Podocyte differentiation and glomerulogenesis. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:806-14.
6. Hinchliffe SA, Sargent PH, Howard CV, Chan YF, van Velzen D. Human intrauterine renal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the dissector method and Cavalieri principle. *Lab Invest* 1991;64:777-84.
7. Undrewood MA, Gillbert WM, Sherman MP. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J Perinatol* 2005;25:341-8.
8. Verburg BO, Geelhoed JJ, Streegers EA, Hofman A, Molli HA, Writteman JC, et al. Fetal kidney volume and its association with growth and blood flow in fetal life.: the generation R study. *Kidney Int* 2007;72:754-61.
9. Guyton AC. *Medicinska fiziologija*. XI hrvatskosrpsko preštampano izdanje. Medicinska knjiga Beograd-Zagreb;1990.
10. Samuel T, Hoy WE, Douglas-Denton R, Hugson MD, Bertram JF. Determination of glomerular volume in different cortical zones in the human kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(10):3102-9.
11. King A, Loke YW. Unexplained fetal growth retardation: what is the cause? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1994;70(3):F225-F227.
12. Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC, editors. *Fanaroff and Martins Neonatal-Perinatal Medicine: diseases of the fetus and infant*. 8th ed. Elsevier; 2006:271-306.
13. Gomella TL, Cunningham MD, Fabien GE. *Neonatology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Education Medical; 2013.
14. Ziegler EE et al. Body composition of the reference fetus. *Growth.* 1976;40(4):329-41.
15. Harrington TAM, Thomas EL, Modi N, Frost GS, Bell JD. Distribution of the adipose tissue in the newborn. *Pediatr Res.* 2004;55(3):437-41.
16. Deepak S, Sweta S, Pradeep S. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clin Med Insights Pediatr.* 2016; 10: 67–83.
17. Fowden AL, Forhead AJ. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction.* 2004;127(5):515–26.)
18. Hone J, Accili D, al-Gazali LI, Lestringant G, Orban T, Taylor SI. Homozygosity for a new mutation (Ile¹¹⁹ → Met) in the insulin receptor gene in five sibs with familial insulin resistance. *J Med Genet.* 1994;31(9):715-6.
19. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S, et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor subunit-1. *Nature.* 1994; 372(6502):182-6.
20. Njolstad R.P, et al. Permanent neonatal diabetes caused by glucocinase deficiency: inborn error of the glucose-insulin signaling pathway. *Diabetes,* 2003;52(11):2854-2860.
21. Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmot I, Sinclair KD. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet.* 2001; 27(2):153-4.
22. Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors and the basis of growth. *N Engl J Med.* 2003; 349(23):2184-6.
23. Rosenfeld RG, Rosenbloom AL, Guevara-Aguirre J. Growth hormone insensitivity due to primary GH receptor deficiency. *Endocr Rev.* 1994;15(3):369-90.
24. Chowen JA, Evain-Brion D, Pozo J, Alsat E, García-Segura LM, Argente J. Decreased expression of placental growth hormone in uterine growth retardation. *Pediatr Res.* 1996;39(4Pt1):736-9.

25. Ishida M. New development in Silver-Russell syndrome and implications for clinical practice. *Epigenomics*.2016;8(4):563-580.
26. Kataria A, Palliyil Gopi R, Mally P, Shah B. Neonatal diabetes mellitus:current perspective. Dove Medical Press. 2014;2014(4):55-64.
27. Fondacci C, Alsat E, Gabriel R, Blot P, Nessmann C, Evain-Brion D. Alterations of human placental epidermal growth factor receptor in intrauterine growth retardation. *J Clin Invest*. 1994;93(3):1149-55.
28. Murphy VE, Smith R, Giles WB, Clifton VL. Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocr Rev*. 2006;27(2):141–69.
29. Clausson B, Gardosi J, Francis A, Cnattingius S. Perinatal outcome in SGA births defined by customized versus population based birth weight standards. *BJOG*. 2001;08(8):830-4.
30. Hooper PM, Mayes DC, Demianczuk NN. A model for fetal growth and diagnosis of intrauterine growth restriction. *Stat Med*. 2002;21(1):95-112.
31. Lackman F, Capewell V, Richardson B, da Silva O, Gagnon R. The risks of spontaneous preterm delivery and perinatal mortality in relation to size at birth according to fetal versus neonatal growth standards. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;184(5):946-53.
32. Papiernik E. Fetal growth retardation: a limit for the further reduction of preterm births. *Matern Child Health J*. 1999;3(2):63-9.
33. Zaw W, Gagnon R, da Silva O. The risks of adverse neonatal outcome among preterm small for gestational age infants according to neonatal versus fetal growth standards. *Pediatrics*. 2003;111(6 Pt 1):1273-7.
34. Gardosi J. New definition of small for gestational age based on fetal growth potential.*Horm Res*. 2006;65 Suppl 3:15-8.
35. Groom KM, Poppe KK, North RA, McCowan LM. Small for gestational age infants classified by customized or population birthweight centiles:impact of gestational age at delivery.*AmJObstet Gynecol*.2007;197(3):239.e1-5.
36. Sharma D, Shastri S, Sharma P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clin Med Insights Pediatr*. 2016; 10: 67–83.
37. Lumey LH. Decreased birthweights in infants after maternal in utero exposure to the Dutch famine of 1944–1945. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*. 1992;6:240-53.
38. McCormick MC. The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *N.Engl J Med*. 1985;312:82-90.
39. Vandenboshe R, Kirchner J. Intrauterine growth retardation. *Am Fam Physion*. 1998; 58(6):1384-1390.
40. Iwata M, Matsuzaki N, Shimizu I, Mitsuda N, Nakayama M, Suehara N. Prenatal detection of ischaemic changes in the placenta of the growth-retardated fetus by Doppler flow velocimetry of the maternal uterine artery. *Obstet Gynecol*. 1993;82(4Pt1):494-9.
41. Mortola JP, Frappell PB, Aguero L, Armstrong K. Birth weight and altitude: A study in Peruvian communities. 2000;136(3):324-329.
42. Singh M. Disorders of weight and gestation. In: Singh M, editor. *In Care of the Newborn*. 5th ed. New Delhi: Sagar Publications; 1999. pp. 224–45.
43. Bahtiyar MO, Copel JA. Cardiac changes in the intrauterine growth restricted fetuses-Seminars in Perinatology.2008;32(3):190-93.
44. Gardosi J, et al. Classification of stillbirth by relevant condition at death (ReCoDe): population based cohort study.*BMJ*.2005;331(7525):1113-7.
45. Cosmi E, Fanelli T, Visentin S, Trevisanuto D, Zanardo V. Consequences in infants that were Intrauterine Growth Restricted. *J Pregnancy*. 2011;2011:364381.
46. Jelks A, Cifuentes R, Ross MG. Clinician bias in fundal heigh measurement.*ObstetGynecol*. 2007;110(4):892-9.
47. Alberry M, Soothill P. Management of fetal growth restriction. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2007;92(1):62–7.
48. Peleg D, Kennedy MC, Hunter KS. Intrauterine Growth restriction: Identification and management. *Am Fam Physician*.1998;58(2):453-60.
49. Giuliano N, Annunziata ML, Tagliaferri S, et al. IUGR Management: New Perspectives. *J Pregnancy*.

- 2014;2014:620976.
50. Veille JC, Kanaan C. Duplex Doppler ultrasonographic evaluation of the fetal renal artery on normal and abnormal fetuses. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 161(6 Pt 1): 1502-7.
 51. Banks EH, Miller DA. Perinatal risks associated with borderline amniotic fluid index. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180(6Pt1):1461-3.
 52. Mari G, Hanif F, Drennan K, Kruger M. Staging of intrauterine growth-restricted fetuses. *J Ultrasound Med.* 2007;26(11):1469-77.
 53. Figueras F, Gratacos E. Stage-based approach to the management of fetal growth restriction. *Prenat Diagn.* 2014;34(7):655-9.
 54. Grivelli RM, Alfirević Z, Gyte GM, Devane D. Antenatal cardiotocography for fetal assesment. *Cochrane database Syst Rev.* 2015; CD007863.
 55. Lalor JG, Fawole B, Alfirević Z, Devane D. Biophysical profile for fetal assesment in high risk pregnancies. *Cochrane database Syst Rev.* 2008;(1):CD000038.
 56. Ferreira RDDS, Negrini R, Bernardo WM, Simões R, Piato S. The effects of sildenafil in maternal and fetal outcomes in pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2019;14(7):e0219732.
 57. Juncao C, Xiaoyuan G, et al. Effect of L-arginine and sildenafil citrate on intrauterine growth restriction fetuses: a meta-analysis. *BMC Pregnancy and Childbirth.* 2016;16:225.
 58. Sommerfelt K et al. Neurophysiological and motor function in a small for gestational age preschoolers- *Pediatric Neurolog.* 2002;26:186.
 59. Hartkopf J, et al. Impact of Intrauterine Growth Restriction on Cognitive and Motor Development at 2 Years of Age. *Front Physiol.* 2018;9:1278.
 60. Chen J, Chen P, Bo T, et al. Cognitive and Behavioral Outcomes of Intrauterine Growth Restriction School-Age Children. *Pediatrics.* 2016;137(4):e20153868.
 61. Strauss RS. Adult functional outcome of those born small for gestational age: twenty-six-year follow-up of the 1970 British Birth Cohort. *JAMA.* 2000;283(5):625-32.
 62. Albertsson-Wikland K, Karlberg J. Natural growth in children born SGA with and without catch up growth. *Horm Res.* 2003;59:129.
 63. Olbertz DM, Mumm R, Wittwer-Backofen U, et al. Identification of growth patterns of preterm and small-for-gestational age children from birth to 4 years - do they catch up? *J Perinat Med.* 2019;47:448.
 64. Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol.* 2006;49(2):270-83.
 65. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ.* 1989; 298(6673):564-7.
 66. Barker D. The Developmental Origins of Adult Disease. *J Am Coll Nutr.* 2004;23(6 Suppl):588S-595S.
 67. De Boo HA, Harding JE. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *ANZJOG.* 2006;46(1):4-14.
 68. Hattersley AT, Tooke JE. The fetal insulin hypothesis: an alternative explanation of the association of low birth weight with diabetes and vascular disease. *Lancet.* 1999;353(9166):1789-92.
 69. Neel JV. Diabetes mellitus: a „thrifty“ genotype rendered detrimental by „progress“? *Am J Hum Genet.* 1962;14:353-62.
 70. Barker DJP. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med.* 2007;261(5):412-7.
 71. Luyckx VA, Compston CA, Simmen T, Mueller TF. Accelerated senescence in kidneys of low-birth-weight rats after catch-up growth. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;297:F1697–705.
 72. Tarry-Adkins JL, Martin-Gronert MS, Chen JH, Cripps RL, Ozanne SE. Maternal diet influences DNA damage, aortic telomere length, oxidative stress, and antioxidant defense capacity in rats. *FASEB J.* 2008;22:2037–44.
 73. Heindel J, Vandenberg L. Developmental Origins of Health and Disease: A Paradigm for Understanding Disease Etiology and Prevention. *Curr Opin Pediatr.* 2015; 27(2): 248– 253.
 74. Sharma D, Farahbakhsh N, Shastri S, Sharma P. Intrauterine growth restriction–part 2. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016 Mar 15:1–12.
 75. Heindel JJ, Balbus J, Birnbaum L, Brune-Drisse MN, et al. Developmental Origins of Health and Disease:

- Integrating Environmental Influences. *Endocrinology*.2015;156(10):3416-21.
76. Silver KL, Singer PA. *Science*.2014.11;345(6193):121.
 77. Brenner BM, Lawler EV, Mackenzie HS. The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. *Kidney International*. 1996;49(6):1774-7.
 78. Luyckx VA, Brenner BM. Low birth weight, nephron number and kidney disease. *Kidney International*. 2005; 68(97):68-77.
 79. Ashton N. Insulin like growth factor, nephrogenesis and hypertension. *Journal of hypertension*.2006; 24:1707-1709.
 80. Jones S, Nyengaard JR. Birth, Barker and Brenner: The Concept of Low Birth Weight and Renal Disease. *The Kidney and Hypertension in Diabetes Mellitus*.2000;11:129-39.
 81. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens*. 1988;1(4Pt1):335-47.
 82. Brenner BM, Anderson S: The interrelationships among filtration surface area, blood pressure, and chronic renal disease. *J Cardiovasc Pharmacol*.1992;19(6):S1-7.
 83. Bertram JF, Douglas-Denton RN, Diouf B, Hughson MD, Hoy WE. Human nephron number: implications for health and disease. *Pediatr Nephrol*.2011;26:1529-33.
 84. Bertram JF. Analyzing renal glomeruli with the new stereology. *Int Rev Cytol*.1995;161:111-72.
 85. Fetterman GH, Shuplock NA, Philipp FJ, Gregg HS. The growth and maturation of human glomeruli and proximal convolutions from term to adulthood. Studies by microdissection. *Pediatrics*.1965;35:601-19.
 86. Hoy WE, Hughson MD, Bertram JF, Douglas-Denton R, Amann K. Nephron number, hypertension, renal disease, and renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:2557-64.
 87. Rodríguez MM, Gómez AH, Abitbol CL, Chandar JJ, Duara S, Zilleruelo GE. Histomorphometric analysis of postnatal glomerulogenesis in extremely preterm infants. *Pediatr Dev Pathol*. 2004; 7(1):17-25.
 88. Gibson IW, Downie TT, More IA, Lindop GB. Atubular glomeruli and glomerular cysts-a possible pathway for nephron loss in the human kidney? *J Pathol*. 1996;179(4):421-6.
 89. Spencer J, Wang Z, Hoy W. Low birth weight and reduced renal volume in aboriginal children. *Am J Kidney Diseases*. 2001;37(5):915-920.
 90. Puelles VG, Douglas-Denton RN, Cullen-McEwen LA et al. Podocyte number in children and adults: Associations with glomerular size and numbers of other glomerular resident cells. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 2277-88.
 91. Okabayashi Y, Kanzaki G, Tsuboi N, Haruhara K, Koike K, Ikegami M, et al. Heterogeneous distribution of glomerular size in adult kidneys with normal renal function. *Pathology International*. 2018; 68(8): 500-1.
 92. Bard J. Traction and the formation of mesenchymal condensations in vitro. *BioEssays* 1990;12:389-393.
 93. Zeman F. Effects of maternal protein restriction on the kidneys of newborn young of rats. *J Nutrition* 1968;94:111-116.
 94. Amri K, Freund N, Van Huyen JP, Merlet-Benichou C, Lelievre-Pegorier M. Altered nephrogenesis due to maternal diabetes is associated with increased expression of IGF-II/mannose-6-phosphate receptor in the fetal kidney. *Diabetes*. 2001;50:1069-75.
 95. Celsi G, Kistner A, Aizman R, et al. Prenatal dexamethasone causes oligonephronia, sodium retention, and higher blood pressure in the offspring. *Pediatr Res*. 1998;44:317-22.
 96. Manalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: A histomorphometric study. *Kidney Int*. 2000;58:770-3.
 97. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med*. 2003;348:101-8.
 98. Keijzer-Veen MG, Schrevel M, Finken JJ, et al. Microalbuminuria and low glomerular filtration rate at young adult age in subjects born very premature and after intrauterine growth retardation. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16(p):2762-8.
 99. Hostetter TH. Hyperfiltration and glomerulosclerosis. *Semin Nephrol*. 2003;23(2):194-9.

100. Wintour EM. The renin-angiotensin system and the development of the kidney. *Trends Endocrinol Metab* 1997;8:199-207.
101. Guron G, Friberg P. An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. *Journal of Hypertension*. 2000;18(2):123–37.
102. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatric Research*. 2001;49(4 I):460–7.
103. McCausland JE, Bertram JF, Ryan GB, Alcorn D. Glomerular number and size following chronic angiotensin II blockade in the postnatal rat. *Exp Nephrol*. 1997;5(3):201-9.
104. Wlodek ME, Westcott K, Siebel AL, Owens JA, Moritz KM. Growth restriction before or after birth reduces nephron number and increases blood pressure in male rats. *Kidney Internatol*. 2008; 74(2): 187-195.
105. Pryde PG, Sedman AB, Nugent CE, Barr M Jr. Angiotensin-converting enzyme inhibitor fetopathy. *J Am Soc Nephrol*. 1993 ;3(9):1575-82.
106. Yoo KH, Wolstenholme JT, Chevalier RL. Angiotensin-converting enzyme inhibition decreases growth factor expression in the neonatal rat kidney. *Pediatr Res*. 1999;42(5):588-92.
107. Nilsson AB, Friberg P, Bonquist L, Lasaitiene D, Marcussen N, Chen Y. Growth hormone aggravates renal abnormalities induced by neonatal enalapril treatment. *Pediatr Nephrol*. 2003; 18: 878–86.
108. Rogers SA, Powell-Braxton L, Hammerman MR: Insulin-like growth factor I regulates renal development in rodents. *Dev Genet* 1999;24:293–8.
109. Baum M. Role of the kidney in the prenatal and early postnatal programming of hypertension. *American Journal of Physiology*. 2010;298(2):235–47.
110. Alwasel SH, Ashton N. Prenatal programming of renal sodium handling in the rat. *Clinical Science*. 2009;117(2):75–84.
111. Vehaskari VM, Stewart T, Lafont D, Soyez C, Seth D, Manning J. Kidney angiotensin and angiotensin receptor expression in prenatally programmed hypertension. *American Journal of Physiology*. 2004;287(2):262–7.
112. Sladek SM, Magness RR, Conrad KP. Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol* 1997; 272:441–63.
113. Baylis C, Mitruka B, Deng A: Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest*. 1992;90: 278–81.
114. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Santamaria J, Avila-Casado C, Soto V, Nepomuceno T, Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ, HerreraAcosta J. Mild hyperuricemia induces vasoconstriction and maintains glomerular hypertension in normal and remnant kidney rats. *Kidney Int*.2005;67: 237–47.
115. Welham SJM, Wade A, Woolf AS. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. *Kidney International*. 2002;61(4):1231–42.
116. Duncan RC, Bass PS, Garrett PJ, Dathan JR. Weight at birth and other factors influencing progression of idiopathic membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*.1994;9:875.
117. Zidar N, Cavic MA, Kenda RB, Koselj M, Ferluga D. Effect of intrauterine growth retardation on the clinical course and prognosis of IgA glomerulonephritis in children. *Nephron*.1998;79:28–32.
118. Zidar N, Avgustin CM, Kenda RB, Ferluga D. Unfavorable course of minimal change nephrotic syndrome in children with intrauterine growth retardation. *Kidney Int*. 1998; 54: 1320–3.
119. Luyckx VA, Shukha K, Brenner BM. Low nephron number and its clinical consequences. *Rambam Maimonides Med J*. 2011;2(4):e0061.
120. Schreuder M, Delemarre-van de Waal H, van Wijk A. Consequences of Intrauterine Growth Restriction for the Kidney. *Kidney Blood Press Res*. 2006;29:108–25.
121. Orendi K, Kivity V, Sammar M, Grimpel Y, Gonen R, Meiri H, et al. Placental and trophoblastic in vitro models to study preventive and therapeutic agents for preeclampsia. *Placenta*. 2011; 32:49-54.
122. Myllynen P, Vahakangas K. Placental transfer and metabolism: an overview of the experimental models utilizing human placental tissue. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 2013;27(1):507-12.
123. Flake AW, Villa RI, Adzick NS, Harrison MR. Transamniotic fetal feeding. A model of intrauterine growth retardation using the relationship of “natural runting” to uterine position. *J Pediatr Surg*. 1987;22(9):816-9.

124. Thakur A, Sase M, Lee JJ, Thakur V, Buchmiller TL. Ontogeny of insulin like growth factor 1 in a rabbit model of growth retardation. *J Surg Res.* 2000;91(2):135-40.
125. Wooding P, Burton G. Comparative placentation: structure, functions and evolutions. Berlin Heidelberg. Springer;2008.
126. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular responses to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small for gestational age infants. *Br J Obstet Gynecol.* 1986;93(10):1049-59.
127. Miller SL, Green LR, Peebles DM, Hanson MA, Blanco CE. Effects on chronic hypoxia and protein malnutrition on growth in the developing chick. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 186(2): 261-7.
128. Wigglesworth JS. Fetal growth retardation. Animal model: uterine vessel ligation in the pregnant rat. *Am J Pathol.* 1974;77(2):347-50.
129. Lumey LH, Stein AD. Offspring birthweights after maternal intrauterine undernutrition: a comparison within sibships. *Am J Epidemiol.* 1997;146(10):810-19.
130. Swanson AM, David AL. Animal models of fetal growth restriction: Considerations for translational medicine. *Placenta.* 2015;36:623-30.
131. Ain R, Canham LN, Soares MJ. Dexamethasone-induced intrauterine growth restriction impacts the placental prolactin family, insulin-like growth factor-II and the Akt signaling pathway. *J Endocrinol.* 2005;185(2):253-63.
132. Lee JY, Park SJ, Kim MH. Prenatal administration of dexamethasone during early pregnancy negatively affects placental development and function in mice. *J Anim Sci.* 2012;90(13):4846-56.
133. Newnham JP, Evans SF, Godfrey M, Huang W, Ikegami M, Jobe A. Maternal, but not fetal, administration of corticosteroids restricts fetal growth. *J Matern Fetal Med.* 1999;8:81-87.
134. Wyrwoll CS, Holmes MC. Prenatal Excess Glucocorticoid Exposure and Adult Affective Disorders: A Role for Serotonergic and Catecholamine Pathways. *Neuroendocrinology.* 2012;95(1):47-55.
135. Waddell BJ, Hisheh S, Dharmarajan AM, Burton PJ. Apoptosis in Rat Placenta Is Zone-Dependent and Stimulated by Glucocorticoids. *Biology of Reproduction.* 2000; 63(6): 1913-17.
136. de Albuquerque Cavalcanti Ferreira Novo AC, dos Santos Rodrigues Sadeck L, Suely Okay TS, Rodrigues Leone C. Longitudinal study of Cystatin C in healthy term newborns. *Clinics (Sao Paulo).* 2011; 66(2): 217-20.
137. Helin I, Axenram M, Grubb A. Serum cystatin C as a determinant of glomerular filtration rate in children. *Clin Nephrol.* 1998;49:221-25.
138. Li Y, Fu C, Zhou X, Xiao Z, Zhu X, Jin M, et al. Urine interleukin 18 and cystatin C as biomarkers of acute kidney injury in critically ill neonates. *Pediatr Nephrol.* 2012;27:851-60.
139. Harmoinen A, Ylinen E, Ala-Houhala M, Janas M, Kaila M, Kouri T. Reference intervals for cystatin C in pre- and full-term infants and children. *Pediatr Nephrol.* 2000;15:105-8.
140. Finney H, Newman J, Thakkar H, Fell JME, Price CP. Reference ranges for plasma cystatin C and creatinine measurement in premature infants, neonates, and older children. *Arc Dis Child.* 2000;82:71-5.
141. Malamitsi-Puchne A, Briana DD, Kontara L, Boutsikou M, Baka S, Hassiakos D, et al. Serum Cystatin C in Pregnancies With Normal and Restricted Fetal Growth. *Reproductive Sciences.* 2007;14 (1):37-42.
142. Sitepu M. Examination of renal function in infants with a history of intrauterine growth restriction up to 36 weeks gestation compared to infants with normal growth. *Sri Lanka Journal of Child Health,* 2017;46(2), pp.152-154.
143. Armangil D, Yurdakok M, Canpolat FE, Tekinalap G. Determination of reference values for plasma Cys and comparison with SCr in premature infants. *Pediatr Nephrol.* 2008;23(11):2081-3.
144. Sarkar PD, Rajeshwari G, Shivaprakash TM. Cystatin C – a novel marker of glomerular filtration rate: a review. *Indian J Clin Biochem.* 2005; 20 (1):139-44.
145. Montini G, Cosmo L, Amici G, Mussap M, Zacchello G. Plasma cystatin C values and inulin clearances in premature neonates. *Pediatr Nephrol.* 2001;16:463-4.
146. Ayyala VL, Devabathina N, Gurappagari P. Effect of gestational age and birth weight on serum creatinine in the first week of newborn life. *Indian J Med Biochem.* 2017;21(2):131-5.

147. Ottonello G, Dessi A, Neroni P, Trudu ME, Manus D, Fanos V. Acute kidney injury in neonatal age. *J Pediatr Neonat Individual Med.* 2014;3(2):e030246.
148. Sandinirwan I, Primadi A, Hilmanto D. Serum creatinine levels to estimate kidney function in small-for-gestational age and appropriate-for-gestational age newborns. *Paediatr Indonesiana.* 2019;58(6):305-11.
149. Harper ME, Barrera-Saldaña HA, Saunders GF. Chromosomal localization of the human placental lactogen-growth hormone gene cluster to 17q22-24. *Am J Hum Genet.* 1982;34:227-34.
150. Fuglsang J, Ovesen P. Aspects of placental growth hormone physiology. *Growth Horm IGF Res.* 2006;16:67-85.
151. Liebhaber SA, Urbanek M, Ray J, Tuan RS, Cooke NE. Characterization and histologic localization of human growth hormone-variant gene expression in the placenta. *J Clin Invest.* 1989;83:1985-91.
152. Sifakis S, Akolekar R, Mantas N, Kappou D, Nicolaides KH. Maternal serum human placental growth hormone (hPGH) at 11 to 13 weeks of gestation in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2011;30:74-82.
153. Frankenne F, Closset J, Gomez F, Scippo ML, Smal 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;66:1171-80.
154. Mittal P, Espinoza J, Hassan S, Kusanovic JP, Edwin SS, et al. Placental growth hormone is increased in the maternal and fetal serum of patients with preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2007;20:651-9.
155. Higgins MF, Russell NE, Crossey PA, Nyhan KC, Brazil DP, McAuliffe FM. Maternal and fetal placental growth hormone and IGF Axis in Type 1 diabetic pregnancy. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e29164.
156. Alsat E, Guibourdenche J, Luton D, Frankenne F, Evain-Brion D. Human placental growth hormone. *AJOG.* 1997;177(6):1526-34.
157. Eriksson L, Frankenne F, Eden S, Hennen G, von Schoultz B. Growth hormone secretion during termination of pregnancy. Further evidence of the placental variant. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1988;67:549-52.
158. Caufriez A, Frankenne F, Hennen G, Copinschi G. Regulation of maternal IGF-I by placental GH in normal and abnormal human pregnancies. *Am J Physiol.* 1993;265:E572-E7.
159. Kędzia A, Petriczko E, Tarka A. Placental growth hormone, pituitary growth hormone, insulin-like growth factor, and ghrelin in umbilical cord blood serum and amniotic fluid. 2013;64(4):293-9.
160. Coutant R, Boux de Casson F, Douay O, Mathieu E, Rouleau S, Beringue F, Gillard P, Limal JM, Descamps P. Relationships between placental growth hormone concentration and maternal smoking, newborn gender and maternal leptin: possible implications for birth weight. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:4854-9.
161. Zeck W, Widberg C, Maylin E, Desoye G, Lang U, McIntyre D, Prins J, Russell A. Regulation of placental growth hormone secretion in a human trophoblast model-the effects of hormones and adipokines. *Pediatr Res.* 2008. 63(4):353-7.
162. Frankenne F, Alsat E, Scippo ML, Igout A, Hennen G, Evain-Brion D. Evidence for the expression of growth hormone receptors in human placenta. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;182:481-6.
163. MacLeod JN, Worsley I, Ray J, Friesen HG, Liebhaber SA, Cooke NE. Human growth hormone-variant is a biologically active somatogen and lactogen. *Endocrinology.* 1991;128:1298-302.
164. Lacroix MC, Bolifraud P, Durieux D, Pauloin A, Vidaud M, Kann G. Placental growth hormone and lactogen production by perfused ovine placental explants: Regulation by growth hormone-releasing hormone and glucose. *Biol Reprod.* 2002;66:555-561.
165. Velegrakis A, Maria Sfakiotaki M, Sifakis S. Human placental growth hormone in normal and abnormal fetal growth. *Biomed Rep.* 2017;7(2):115-22.
166. Barbour LA, Shao J, Qiao L, Pulawa LK, Jensen DR, Bartke A, Garrity M, Draznin B, Friedman JE. Human placental growth hormone causes severe insulin resistance in transgenic mice. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 186(3):512-7.
167. Eleftheriades M, Papastefanou I, Lambrinouadaki I, Kappou D, Lavranos D, Akalestos A, Souka AP, Pervanidou P, Hassiakos D, Chrousos GP. Elevated placental growth factor concentrations at 11-14 weeks of gestation to predict gestational diabetes mellitus. *Metabolism.* 2014;63:1419-1425.

168. Ringholm L, Juul A, Pedersen-Bjergaard U, Thorsteinsson B, Damm P, Mathiesen ER. Lower levels of placental growth hormone in early pregnancy in women with type 1 diabetes and large for gestational age infants. *Growth Horm IGF Res.* 2015; 25(6):312-5
169. Freemark M. Regulation of maternal metabolism by pituitary and placental hormones: Roles in fetal development and metabolic programming. *Horm Res.* 2006;65(3):41-9.
170. Lacroix MC, Guibourdenche J, Frenzo JL, Pidoux G, Evain-Brion D. Placental growth hormones. *Endocrine.* 2002;19(1):73-9.
171. Benton SJ, McCowan LM, Heazell AEP, Grynspan D, Hutcheon JA, Senger C, et al.. Placental growth factor as a marker of fetal growth restriction caused by placental dysfunction. *Placenta.* 2016;42:1-8.
172. Jenkinson CM, Min SH, Mackenzie DD, McCutcheon SN, Breier BH, Gluckman PD. Placental development and fetal growth in growth hormone-treated ewes. *Growth Horm Res.* 1999;9(1):11-7.
173. Frenzo JL, Vidaud M, Guibourdenche J, Luton D, Muller F, Bellet D, et al. Defect of Villous Cytotrophoblast Differentiation into Syncytiotrophoblast in Down's Syndrome *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2000; 85(10): 3700-7.
174. Moghadam S, Engel W, Bougoussa M, Hennen G, Igout A, Sancken U. Maternal serum placental growth hormone and insulin like growth factor binding proteins 1 and 3 in pregnancies affected by fetal aneuploidy and other abnormalities: Implications for prenatal diagnosis of trisomy 21. *Fetal Diagn Ther.* 1998;13:291-7.
175. 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;34:439-42.
176. Chowen JA, Evain-Brion D, Pozo J, Alsat E, Garcia-Segura LM, Argente J. Decreased expression of placental growth hormone in intrauterine growth retardation. *Pediatr Res.* 1996; 39:736-9.
177. Fowden AL, Forhead AJ. Endocrine regulation of feto-placental growth. *Horm Res.* 2009;72:257-265.
178. McIntyre HD, Serek R, Crane DI, Veveris-Lowe T, Parry A, Johnson S, Leung KC, Ho KK, Bougoussa M, Hennen G, et al. Placental growth hormone (GH), GH-binding protein, and insulin-like growth factor axis in normal, growth-retarded, and diabetic pregnancies: Correlations with fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:1143-1150.
179. Pedersen NG, Juul A, Christiansen M, Wørdemann KR, Tabor A. Maternal serum placental growth hormone, but not human placental lactogen or insulin growth factor-1, is positively associated with fetal growth in the first half of pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010;36:534-541.
180. Salmon WD, Daughaday W. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 1957;49:825-36.
181. Froesch ER, Burgi H, Ramseier EB, et al. Antibody-suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *J Clin Invest* 1963;42:1816-34.
182. Daughaday WH, Hall K, Raben MS, et al. Somatomedin: a proposed designation for the sulfation factor. *Nature* 1972;235:107.
183. Rinderknecht E, Humbel RE. Polypeptides with non-suppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73:2365-9.
184. Mullis PE, Patel MS, Brickell PM, et al. Growth characteristics and response to growth hormone therapy in patients with hypochondroplasia: genetic linkage of the insulin-like growth factor I gene at chromosome 12q23 to the disease in a subgroup of these patients. *Clin Endocrinol* 1991;34:265-74.
185. Yakar S, Werner H, Rosen CJ. Insulin like growth factor: actions on the skeleton. *J Mol Endocr.* 2018;61(1):115-37.
186. Lewitt MS, Saunders H, Phuyal JL, et al. Complex formation by human insulin-like growth factor-binding protein-3 and human acid-labile subunit in growth hormone-deficient rats. *Endocrinology* 1994;134:2402-9.
187. D'Ercole AJ, Applewhite GT, Underwood LE. Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Dev Biol.* 1980;75(2):315-28.
188. Baserga R, Peruzzi F, Reiss K. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer.* 2003;107(6):873-7.

189. Clemmons DR. 40 years of IGF1: Role of IGF binding proteins in regulating IGF response to changes in metabolism. *J Mol Endocrinol.* 2018;61(1):139-69.
190. Annenkov A. The insulin-like growth factor (IGF) receptor type 1 (IGF1R) as an essential component of the signalling network regulating neurogenesis. *Mol Neurobiol.* 2009;40(3):195-215.
191. Silva JR, Figueiredo JR, van den Hurk R: Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology.* 2009;71(8):1193-1208.
192. Murphy LJ, Friesen HG. Differential effects of estrogen and growth hormone on uterine and hepatic insulin-like growth factor I gene expression in the ovariectomized hypophysectomized rat. *Endocrinology.* 1988; 122(1):325-32.
193. Desbois-Mouthon C, Wendum D, Cadoret A, Rey C, Leneuve P, Blaise A, Housset C, Tronche F, Le Bouc Y, Holzenberger M. Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R knockout. *FASEB J.* 2006;20(6):773-5.
194. Bach LA. The insulin-like growth factor system in kidney disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2012;21(1):86-91.
195. Flyvbjerg A. Putative pathophysiological role of growth factors and cytokines in experimental diabetic kidney disease. *Diabetologia.* 2000;43(10):1205-23.
196. Chisalita SI, Johansson GS, Liefvendahl E, Back K, Arnqvist HJ. Human aortic smooth muscle cells are insulin resistant at the receptor level but sensitive to IGF1 and IGF2. *J Mol Endocrinol.* 2009;43(6):231-9.
197. Robbins K, McCabe S, Scheiner T, Strasser J, Clark R, Jardieu P. Immunological effects of insulin-like growth factor-I—enhancement of immunoglobulin synthesis. *Clin Exp Immunol.* 1994;95(2):337-42.
198. Smith TJ. Insulin-like growth factor-I regulation of immune function: a potential therapeutic target in autoimmune diseases?. *Pharmacol Rev.* 2010;62(2):199-236.
199. Mathews LS, Hammer RE, Behringer RR, et al. Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. *Endocrinology.* 1988;123:2827–33.
200. Yakar S, Werner H, Rosen CJ. Insulin like growth factor: actions on the skeleton. *J Mol Endocr.* 2018;61(1):115-37.
201. Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev Biol.* 2001;229(1):141-62.
202. Hynes MA, Van Wyk JJ, Brooks PJ, D'Ercole AJ, Jansen M, Lund PK. Growth hormone dependence of somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acids. *Mol Endocrinol.* 1987;1(3):233-42.
203. Ye P, Li L, Richards RG, DiAugustine RP, D'Ercole AJ. Myelination is altered in insulin-like growth factor-I null mutant mice. *J Neurosci.* 2002;22(14):6041-51.
204. Wit JM, van Unen H. Growth of infants with neonatal growth hormone deficiency. *Arch Dis Child.* 1992;67(7):920-4.),(Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell.* 1993;75(1):73-82.
205. Randhawa R, Cohen P: The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth. *Mol Genet Metab.* 2005;86(1–2):84-90.
206. Koutsaki M, Sifakis S, Zaravinos A, Koutroulakis D, Koukoura O, Spandidos DA. Decreased placental expression of hPGH, IGF-I and IGFBP-1 in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Growth Horm IGF Res.* 2011;21(1):31-6.
207. Setia S, Sridhar MG. Changes in GH/IGF-1 axis in intrauterine growth retardation: consequences of fetal programming?. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme.* 2009;41(11):791-8.
208. Jaquet D, Vidal H, Hankard R, Czernichow P, Levy-Marchal C. Impaired regulation of glucose transporter 4 gene expression in insulin resistance associated with in utero undernutrition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(7):3266-71.
209. Laron Z, Erster B, Klinger B, Anin S. Effect of acute administration of insulin-like growth factor 1 in patients with Laron-Type dwarfism. *The Lancet.* 1988;332(8621):1170-2.

210. Rasmussen SK, Lautier C, Hansen L, Echwald SM, Hansen T, Ekstrom CT, Urhammer SA, Borch-Johnsen K, Grigorescu F, Smith RJ, Pedersen O. Studies of the variability of the genes encoding the insulin-like growth factor I receptor and its ligand in relation to type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocr. Metab.* 2000;85:1606-10.
211. Arends N, Johnston L, Hokken-Koelega A, Van Duijn C, De Ridder M, Savage M, Clark A. Polymorphism in the IGF-I gene: clinical relevance for short children born small for gestational age (SGA). *J. Clin. Endocr. Metab.* 2002;87:2720-4.
212. Puche JE, Castilla-Cortázar I. Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *J Transl Med.* 2012;10:224.
213. Rosenbloom AL. The role of recombinant insulin like growth factor 1 in the treatment of the short child. *Curr Opin Pediatr.* 2007;19(4):458-64.
214. Švob M. *Histopatološka tehnika (priručnik)*. Univerzitetско medicinski centar Sarajevo, Viša medicinska škola. 1975.
215. Boubred F, Saint-Faust M, Buffat C, Ligi I, Grandvuillemin I, Simeoni U. Developmental Origins of Chronic Renal Disease: An Integrative Hypothesis. *Int J Nephrol.* 2013; 2013:12 pages.
216. Franco MCP, Oliveira V, Ponzio B, Rangel M, Palomino Z, Gil FZ. Influence of Birth Weight on the Renal Development and Kidney Diseases in Adulthood: Experimental and Clinical Evidence. *Int J Nephrol.* 2012;2012:608025
217. Giapros V, Drougia A, Hotoura E, Papadopoulou E, Argyropoulou M, Andronikou S. Kidney growth in small-for-gestational-age infants: evidence of early accelerated renal growth. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2006;21(12):3422-7.
218. Franke D, Völker S, Haase S, Pavičić L, Querfeld U, Ehrich JHH, Živičnjak M. Prematurity, small for gestational age and perinatal parameters in children with congenital, hereditary and acquired chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2010;25(12):3918-24.
219. Milojković M. Uticaj darbeopetina alfa na broj glomerula novorođenih miševa sa intrauterusnom restrikcijom rasta. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet; 2016.
220. Bagby SP. Developmental Origins of Renal Disease: Should Nephron Protection Begin at Birth? *CJASN.* 2009;4(1):10-3.
221. Manalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: A histomorphometric study. *Kidney Int.* 2000;58:770-3.
222. Zohdi V, Sutherland MR, Lim K, Gubhaju L, Zimanyi MA, Black MJ. Low Birth Weight due to Intrauterine Growth Restriction and/or Preterm Birth: Effects on Nephron Number and Long-Term Renal Health. *International Journal of Nephrology.* 2012; Article ID 136942, 13 pages.
223. Benz K, Amann K. Maternal nutrition, low nephron number and arterial hypertension in later life. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2010;1802(12):1309-17.
224. Singh GR, Hoy WE. Kidney volume, blood pressure, and albuminuria: Findings in an Australian aboriginal community. *AmJ Kidney Dis.* 2004;43:254-9.
225. Hoy WE, Douglas-Denton R, Hughson M, Cass MD, Johnson K, Bertram JF. A stereological study of glomerular number and volume: Preliminary findings in a multiracial study of kidneys at autopsy. *Kidney Int Suppl.* 2003;63:31-7.
and renal dysfunction in adulthood. *Am J of Physiol-Endocrinol Metab.* 2002;283(1):124-31.
226. Merlet-Bénichou C, Gilbert T, Muffat-Joly M, Lelièvre-Pégorier M, Leroy B. Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. *Pediatr Nephrol.* 1994;8(2):175-80.
227. Battista M-C, Oligny LL, St-Louis J, Brochu M. Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension
228. Franco MCP, Oliveira V, Ponzio B, Rangel M, Palomino Z, Zaladek Gil F. Influence of Birth Weight on the Renal Development and Kidney Diseases in Adulthood: Experimental and Clinical Evidence. *Int J Nephrol.* 2012; 2012:608025.
229. Mesquita FF, Gontijo JAR, Boer PA. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2010;43(11):1010-8.

230. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med.*2003;348(2):101-8.
231. Baldelomar EJ, Charlton JR, Beeman SC, Bennett KM. Measuring rat kidney glomerular number and size in vivo with MRI. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2018;314(3):399–406.
232. Allegaert K, Mekahli Dj, van den Anker J, Smits A. Creatinine at Birth Correlates with Gestational Age and Birth Weight: Another Factor of the Imbroglia in Early Neonatal Life. *Neonatology.* 2020;117(5):1-4.
233. Rodriguez-Soriano J, Aguirre M, Oliveros R, Vallo A. Long-term renal follow-up of extremely low birth weight infants. *Pediatr Nephrol.*2005;20:579–84.
234. Luyckx VA, Shukha K, Brenner MB. Low Nephron Number and Its Clinical Consequences. *Rambam Maimonides Med J.* 2011;2(4):e0061.
235. Cassidy-Bushrow AE, Wegienka G, Barone CJ, Valentini RP, Yee J, Havstad S, Cole Johnson C. Race-specific relationship of birth weight and renal function among healthy young children. *Pediatr Nephrol.* 2012; 27(8):1317–23.
236. Hallan S, Euser AM, Irgens LM, Finken MJJ, Holmen J, Dekker FW. Effect of Intrauterine Growth Restriction on Kidney Function at Young Adult Age: The Nord Trøndelag Health (HUNT 2) Study.*AJKD.*2008;51(1):10-20.
237. Shiozaki Y, Fujikura T, Isobe S et al. Case report: increased single-nephron estimated glomerular filtration rate in an adult patient with low birth weight. *BMC Nephrol.* 2020;21:75.
238. Barbati A, Cappuccini B, Aisa MC, Grasselli C, Zamarrá M, Bini V et al. Increased Urinary Cystatin-C Levels Correlate with Reduced Renal Volumes in Neonates with Intrauterine Growth Restriction. *Neonatology.* 2016;109:154–60.
239. Kwinta P, Klimek M, Drozd D, et al. Assessment of long-term renal complications in extremely low birth weight children. *Pediatric Nephrology.* 2011;26(7):1095–1103.
240. Starzec K, Klimek M, Grudzień A, Jagła M, Kwinta P. Longitudinal assessment of renal size and function in extremely low birth weight children at 7 and 11 years of age. *Pediatr Nephrol.* 2016; 31(11): 2119–26.
241. Bardallo C L. Serum cystatin C levels in preterm newborns in our setting: Correlation with serum creatinine and preterm pathologies.*Nefrologia.*2015;35(3):296-303.
242. Kastl JT. Renal function in the fetus and neonate – the creatinine enigma. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine.* 2017; 22(2):83-9.
243. Petri CL. *Current Medicinal Chemistry.*2022;29(23).
244. Boubred F, Daniel L, Buffat C, Tsimaratos M, Oliver C, Lelièvre-Pégorier M, Simeoni U. The magnitude of nephron number reduction mediates intrauterine growth-restriction-induced long term chronic renal disease in the rat. A comparative study in two experimental models. *J Transl Med.*2016;14:331
245. Freemark M. Placental Hormones and the Control of Fetal Growth. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2010; 95(5):2054–7.
246. Kumar P, Magon N. Hormones in pregnancy. *Niger Med J.* 2012;53(4):179-83.
247. Martin-Estal I. Erratum To: Intrauterine Growth Retardation (IUGR) as a Novel Condition of Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) Deficiency. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2016;170:129.
248. Sundeep G. Keswani et al. Intraplacental Gene Therapy with Ad-IGF-1 Corrects Naturally Occurring Rabbit Model of Intrauterine Growth Restriction. *Hum Gene Ther.* 2015; 26(3):172–182.
249. Youngman Oh. The insulin-like growth factor system in chronic kidney disease: Pathophysiology and therapeutic opportunities. *Kidney Res Clin Pract.* 2012;31(1):26–37.
250. Matejka G.L., Jennische E. Local infusion of IGF-1 into the kidney of pituitary intact rats induces renal growth. *Acta Physiol Scand.* 1992;145:7–18
251. Low Birth Weight and Nephron Number Working Group. The Impact of Kidney Development on the Life Course: A Consensus Document for Action. *Nephron Clin Pract.* 2017;136(1):3-49.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Утицај плаценталног хормона раста и инсулину сличног фактора раста 1 на гломеруле бубрега мишева рођених са интраутерусном рестрикцијом раста
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Завод за антирабичну заштиту - Пастеров завод Нови Сад б) Медицински факултет Нови Сад, Институт за хистологију и ембриологију в) Здравствена установа Медлаб, Завод за лабораторијску дијагностику
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду
1. Опис података
1.1 Врста студије <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> Експериментална лабораторијска студија током које је коришћен експериментални анимални модел ИУГР у коме су гравидне женке добијале дексаметазон у дози од 100µг/кг/дан супкутано од 15-21. дана гестације, тј. до дана порођаја. По методи случајног избора младунци су разврстани у једну од шест група, по десет мишева у свакој и остављени на природној исхрани. Жртвовани су након месец дана. Из срца се узело 0,5мл крви за анализу концентрације цистатина Ц и креатинина, а потом је код сваке жртвоване јединке одстрањен по један бубрег. Хистолошком обрадом су добијене плочице које су анализирани уз помоћ дигиталног микроскопа, скениране и преведене у дигиталну форму. Употребом софтверских система израчуната је нумеричка густина и волумен гломерула сваке групе појединачно, у све три зоне коре бубрега.
1.2 Врсте података а) <u>квантитативни</u> б) квалитативни

1.3. Начин прикупљања података

- a) анкете, упитници, тестови
- б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи
- в) генотипови: навести врсту _____
- г) административни подаци: навести врсту _____
- д) узорци ткива: навести врсту патохистолошке плочице са ткивом бубрега које обухвата централни попречни исечак дебљине 3мм којим је обухваћен хилус бубрега.
- ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____
- е) текст, навести врсту релевантне публикације
- ж) мапа, навести врсту _____
- з) остало: описати крв за лабораторијску анализу концентрације креатинина и цистатина Ц

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- a) Excel фајл, датотека __.xls
- б) SPSS фајл, датотека __.version 17
- с) PDF фајл, датотека __.pdf
- д) Текст фајл, датотека __.docx
- е) JPG фајл, датотека __.jpg
- ф) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- a) број варијабли велики
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) : 57 испитаника

1.3.3. Поновљена мерења

- a) да
- б) **не**

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- a) временски размак између поновљених мера је _____

- б) варијабле које се више пута мере односе се на _____
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) **Да**

б) *Не*

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- а) експеримент, навести тип експериментална лабораторијска студија
- б) корелационо истраживање, навести тип _____
- ц) анализа текста, навести тип _____
- д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

1. Ротациони микротом (Leica, Немачка) – омогућио сечење парафинских калупа са ткивом бубрега. Калупи су сечени при дебљини од 5µм на два суседна реза и бојени Н&Е и PAS методом.

2. Дигитални микроскоп VisionTek® (Sakura, Japan) на коме су добијене хистолошке плочице скениране при увећању 100x и преведене у дигиталну форму. Коришћен је софтверски систем Image Tool (IT) 3.0 (UTHSCSA, Америка)

3. Биохемијски принцип одређивања креатинина је спектрофотометријско одређивање са алкалним пикратом, по Jaffe-овој модификованој методи.

4. Биохемијски принцип одређивања цистатина Ц се заснива на специфичној реакцији са антителима хватачима и антителима детекторима који везују цистатин Ц из узорка. Овај комплекс (хватајуће антитело/аналит/детектујуће антитело) је имобилисан преко специфичних анти-хватач антитела којим су обложене ELISA чашице. За конструисање стандардне криве и прерачунавање резултата коришћен је софтвер Curve Expert 1.4.

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података?
 - б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не
 - в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података
-

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Узорковање крви за лабораторијске анализе и прављење патохистолошких плочица вршено је уз адекватну припрему, након чега су лабораторијске и хистолошке анализе рађене стандардизованим техникама и методама у аутоматизованим уређајима. Квалитет лабораторијских резултата је контролисан у складу са стандардима добре лабораторијске праксе и по стандардној лабораторијској процедури валидације добијених резултата. Квалитет података је контролисан детаљном постпроцедуралном обрадом, адекватним статистичким методама и поређењем са релевантним публикацијама.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Подаци добијени као резултати лабораторијских и хистолошких анализа придруживани су одговарајућим шифрама које су додељене испитаницима. Унос података у матрицу контролисан је двоструким прегледом.

3. Третман података и пратећа документ

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у репозиторијуму докторских дисертација Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса <http://cris.uns.ac.rs/searchDissertation.jsf>

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- а) Да
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____
- в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? Трајно

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и

одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

21.03.2018. - Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Универзитета у Новом Саду.

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство-некомерцијално-без прераде. Дозвољава се умножавање, дистрибуција и јавно саопштавање дела, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Наташа Сташук

natasa.stasuk72@gmail.com

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Наташа Сташук

natasa.stasuk72@gmail.com

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Наташа Сташук

natasa.stasuk72@gmail.com