

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Aleksandra A. Vilotić

**ZNAČAJ FAKTORA INHIBICIJE
MIGRACIJE MAKROFAGA ZA
FUNKCIJU TROFOBLASTA ČOVEKA**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Aleksandra A. Vilotić

**IMPORTANCE OF MACROPHAGE
MIGRATION INHIBITORY FACTOR FOR
HUMAN TROPHOBLAST FUNCTION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Mentori

dr Milica Jovanović Krivokuća, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za primenu nuklearne energije, INEP

dr Maja Čakić-Milošević, docent

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Članovi komisije

dr Milica Jovanović Krivokuća, mentor

viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za primenu nuklearne energije,
INEP

dr Maja Čakić-Milošević, mentor

docent, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Ljiljana Vićovac Panić, član

naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za primenu nuklearne energije, INEP

dr Biljana Božić Nedeljković, član

redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

prof dr Svetlana Vrzić Petronijević, član

vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Datum odbrane:

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za biologiju reprodukcije Instituta za primenu nuklearne energije, INEP, Univerziteta u Beogradu kao deo istraživanja u okviru projekta „Trofoblast i ekstraembrionalne fetalne ćelije: plastičnost, faktori diferencijacije i in vitro modulacija funkcionalnih svojstava“ finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Zahvaljujem se svojoj mentorki, dr Milici Jovanović Krivokući, na neiscrpnj pomoći, stručnim savetima i sugestijama tokom celokupne izrade ove disertacije. Posebno se zahvaljujem na pozitivnom pristupu, entuzijazmu i konstantnom podstreku u radu.

Dr Ljiljani Vićovac Panić se zahvaljujem na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da radim u okviru grupe koju vodi. Zahvaljujući velikom iskustvu i znanju koje poseduje kao i mnogim korisnim sugestijama ova disertacija je značajno dobila na kvalitetu.

Dr Maji Čakić-Milošević i profesorki dr Biljani Božić Nedeljković se zahvaljujem na korisnim savetima i sugestijama u završnoj fazi izrade ove teze.

Zahvaljujem se profesorki dr Svetlani Vrzić Petronijević i profesoru dr Milošu Petronijeviću na pomoći u pribavljanju uzoraka.

Veliku zahvalnost dugujem koleginicama iz svoje grupe, kao i ostalim kolegama iz Instituta INEP na druženju, pomoći i podršci tokom rada na ovoj tezi.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, sestri i dragim prijateljima na bezrezervnoj ljubavi, razumevanju i podršci tokom svih ovih godina.

Značaj faktora inhibicije migracije makrofaga za funkciju trofoblasta čoveka

Sažetak

Faktor inhibicije migracije makrofaga (MIF) je multifunkcionalni citokin koji je široko eksprimiran u zoni interakcije tkiva majke i fetusa, naročito u decidualnim stromalnim ćelijama i ćelijama ekstravilusnog i vilusnog citotrofoblasta. Podaci iz literature ukazuju na značajnu ulogu ovog citokina u implantaciji i placentaciji. Cilj ovog rada je dalje ispitivanje značaja MIF za funkciju trofoblasta čoveka *in vitro* u fiziološkim uslovima i u određenim patološkim stanjima kao što su infekcija i trofoblastni maligniteti.

Pomoću utišavanja ekspresije MIF u ekstravilusnoj trofoblastnoj HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji putem specifičnih malih interferirajućih RNK ispitivali smo ulogu endogenog MIF u invaziji trofoblasta, u diferencijaciji ka endotelnom fenotipu i u interakciji trofoblasta i endotelnih ćelija. Pokazali smo da je utišavanje ekspresije endogenog MIF smanjilo invazivna svojstva HTR-8/SVneo ćelija posredstvom smanjene ekspresije efektornih molekula kao što su matriksne metaloproteinaze 2 i 9 i integrinske subjedinica α_1 . Originalna saznanja u okviru ove teze pokazala su da je smanjena ekspresija MIF uticala negativno na diferencijaciju HTR-8/SVneo ćelija ka endotelnom fenotipu kao i na sposobnost integracije ovih ćelija u endotelni monosloj. Ekspresija N-kadherina, proteina značajnog za interakciju trofoblasta i endotelnih ćelija, bila je smanjena nakon utišavanja ekspresije MIF. Ovi podaci ukazuju da bi MIF mogao uticati na interakciju trofoblastnih i endotelnih ćelija regulišući ekspresiju N-kadherina.

Pored toga, pokazali smo da je tretman HTR-8/SVneo ćelija lipopolisaharidom doveo do povećane ekspresije *MIF* iRNK i sekrecije ovog proteina što ukazuje na učešće MIF u citokinskom odgovoru trofoblasta na infekciju.

U okviru ovog rada po prvi put je ispitana diferencijalna sekrecija i ekspresija MIF i njegovih receptora kod HTR-8/SVneo ćelijske linije normalnog trofoblasta i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelijskih linija. Utvrdili smo da postoji razlika u molekulskim formama MIF proteina, u njegovoj sekreciji kao i u ekspresiji gena za MIF receptore na iRNK nivou kod ispitivanih ćelijskih linija što može ukazivati na različit

značaj MIF za normalni i transformisani trofoblast i na njegovu potencijalnu ulogu u malignoj transformaciji trofoblasta.

Dobijeni rezultati predstavljaju napredak u razumevanju značaja MIF za funkciju trofoblasta čoveka *in vitro*. Takođe, ovaj rad pruža uvid u moguću ulogu MIF u određenim patološkim stanjima u trudnoći dajući osnovu za dalja istraživanja mehanizma delovanja ovog citokina što bi moglo doprineti boljem razumevanju etiologije, ranijem otkrivanju i boljem tretmanu patologija u trudnoći.

Ključne reči: MIF, trofoblast, endovaskularni trofoblast, infekcija, HTR-8/SVneo, horiokarcinom

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija reprodukcije

Importance of Macrophage Migration Inhibitory Factor for Human Trophoblast Function

Abstract

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a multifunctional cytokine widely expressed at the feto-maternal interface, especially in decidual stromal cells and both extravillous and villous cytotrophoblast cells. Data from literature indicate an important role of this cytokine in implantation and placentation. This work aimed to study further relevance of MIF for human trophoblast function *in vitro* under physiological and certain pathological conditions such as infection and trophoblast malignancies.

Using MIF silencing in HTR-8/SVneo extravillous trophoblast cell line by small interfering RNA we studied role of endogenous MIF in trophoblast invasion, differentiation to endothelial phenotype, and in interaction of trophoblast and endothelial cells. We showed that MIF silencing reduced invasive properties of HTR-8/SVneo cells by decreasing expression of effector molecules such as matrix metalloproteinase 2 and 9, and integrin subunit α_1 . The original data presented in this thesis show that MIF silencing negatively affected differentiation of HTR-8/SVneo cells to endothelial phenotype and their ability to integrate into an endothelial monolayer. Expression of N-cadherin, important protein for interaction of trophoblast and endothelial cells, was downregulated in HTR-8/SVneo cells after MIF silencing. These data indicate that MIF could affect interaction of trophoblast and endothelial cells by regulating N-cadherin expression.

Furthermore, we present data to show that lipopolysaccharide treatment of HTR-8/SVneo cells led to *MIF* mRNA expression upregulation and an increase in the secretion of this protein which indicates participation of MIF in trophoblast cytokine response to infection.

Differential expression and secretion of MIF and its receptors were studied here for the first time in HTR-8/SVneo normal trophoblast cell line and in JAr and Jeg-3 choriocarcinoma cell lines. Significant difference was determined in MIF protein molecular forms, secretion of MIF, and mRNA expression of MIF receptors' genes

among studied cell lines which point to different relevance of MIF for normal and transformed trophoblast and potential role of MIF in trophoblast malignant transformation.

The obtained results improve current understanding of MIF significans for human trophoblast function *in vitro*. Furthermore, this work provides insight into the potential role of MIF in certain pathological states in pregnancy as a base for further study on mechanisms of action of this cytokine which could contribute to understanding of the etiology, earlier detection, and better treatment of pregnancy patothologies.

Key words: MIF, trophoblast, endovascular trophoblast, infection, HTR-8/SVneo, choriocarcinoma

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biology of reproduction

SKRAĆENICE

BSA - albumin iz goveđeg seruma	siRNA – mala interferirajuća ribonukleinska kiselina
CD 74 - MIF receptor	JAr - horiokarcinomska ćelijska linija
cDNK - komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina	Jeg-3 - horiokarcinomska ćelijska linija
CXCR2 - nekласičan MIF receptor	LPS - lipopolisaharid
DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol	MAP kinaza - mitogenom aktivirane protein kinaza
DMEM/F12 - Dulbecco-va modifikacija Eagle-ovog medijuma sa Ham- ovom hranljivom smešom	MIF - faktor inhibicije migracije makrofaga
dNK ćelije - decidualne urođenobilačke ćelije	MMP - matriksna metaloproteinaza
E₂ - 17β-estradiol	MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazol bromid
ECM - vanćelijski matriks	PBS - fosfatni pufer
EDTA - etilendiamintetrasirćetna kiselina	RPMI 1640 - medijum za gajenje HTR- 8/SVneo ćelija
EMT - epitelo-mezenhimska tranzicija	PAGE - poliakrilamidna gel elektroforeza
EVT - ekstravilusni trofoblast	qPCR - kvantitativna polimerazna lančana reakcija
FCS - fetalni teleći serum	SDS - natrijum dodecil sulfat
HIF-1α - hipoksijom indukovani faktor 1 α	TIMP - tkivni inhibitor matriksnih metaloproteinaza
HTR-8/SVneo - ekstravilusna trofoblastna ćelijska linija čoveka	TLR - receptor sličan Tollu
HUVEC - primarne endotelne ćelije izolovane iz vene pupčanika čoveka	TNF-α - faktor nekroze tumora α
iEVT – intersicijalni ekstravilusni trofoblast	VEGF - vaskularni endotelni faktor rasta
IL - interleukin	vEVT - endovaskularni ekstravilusni trofoblast
iRNK - informaciona ribonukleinska kiselina	
ISO-1 - (S,R)-3-(4-hidroksifenil)-4,5- dihidro-5-izoksazol metil acetat	

SADRŽAJ

UVOD	1
1.1. Placenta čoveka – građa i funkcija	2
1.2. Stadijumi razvoja placente čoveka	4
1.2.1. Preimplantaciona faza	4
1.2.2. Implantacija	6
1.2.3. Razvoj placente	8
1.3. Diferencijacija ekstravilusnog trofoblasta	10
1.4. Remodelovanje decidualnih spiralnih arterija	13
1.5. Medijatori trofoblastne invazije	14
1.6. Infekcija i trofoblast	17
1.7. Horiokarcinom	18
1.8. Faktor inhibicije migracije makrofaga (MIF)	19
1.8.1. MIF - gen i protein	19
1.8.2. Ekspresija i sekrecija MIF	20
1.8.3. Receptori za MIF.....	22
1.8.4. Biološke funkcije MIF	23
1.8.5. MIF i kancerogeneza	24
1.8.6. MIF u trudnoći	25
1.8.7. MIF i funkcija placente	26
CILJ ISTRAŽIVANJA	28
MATERIJAL I METODE	30

3.1. Čelijska kultura	31
3.1.1. Čelijska kultura HTR-8/SVneo trofoblastne čelijske linije	31
3.1.2. Čelijska kultura horiokarcinomskih čelijskih linija JAr i Jeg-3	32
3.1.3. Čelijska kultra endotelnih ćelija izolovanih iz vene pupčanika čoveka (HUVEC)	32
3.1.4. Priprema kondicioniranih medijuma za ispitvanje sekrecije MIF	33
3.2. Transfekcija HTR-8/SVneo ćelija malim interferirajućim RNK	34
3.3. Imunofluorescentno bojenje ćelija	35
3.4. Određivanje broja vijabilnih i adherentnih ćelija (MTT i Crystal violet test)	35
3.5. Funkcionalni <i>in vitro</i> testovi	37
3.5.1. Test čelijske invazije	37
3.5.2. Test formiranja tubula	37
3.5.3. Ko-kultura trofoblastnih HTR-8/SVneo i endotelnih HUVEC ćelija	38
3.6. Kvantitativna PCR analiza	39
3.7. Izdvajanje subćelijskih frakcija	40
3.8. Elektroforetsko razdvajanje proteina i Western blot analiza	41
3.9. Zimografsko određivanje aktivnosti enzima	44
3.10. Protočna citofluorimetrija	45
3.11. Statistička obrada podataka.....	45
REZULTATI	47
4.1. Značaj endogenog MIF za funkciju ekstravilusnih trofoblastnih HTR-8/SVneo ćelija	48
4.1.1. Utišavanje ekspresije <i>MIF</i> gena u transfekovanim HTR-8/SVneo ćelijama .	48
4.1.2. Uticaj utišavanja ekspresije <i>MIF</i> gena na invazivnost HTR-8/SVneo ćelija .	49
4.1.3. Uticaj utišavanja ekspresije <i>MIF</i> gena na nivo MMP2 i MMP9 u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija	50

4.1.4. Uticaj utišavanja ekspresije <i>MIF</i> gena u HTR-8/SVneo ćelijama na ekspresiju integrinskih subjedonica α_1 , α_5 i β_1	51
4.1.5. Uticaj utišavanja ekspresije <i>MIF</i> gena na sposobnost HTR-8/SVneo ćelija da formiraju tubularne strukture	52
4.1.6. Uticaj utišavanja ekspresije <i>MIF</i> gena na integraciju transfekovanih HTR-8/SVneo ćelija u monosloj endotelinih HUVEC ćelija	53
4.1.7. Uticaj kondicioniranih medijuma HTR-8/SVneo ćelija nakon utišavanja ekspresije <i>MIF</i> gena na vijabilnost i broj adherentnih HUVEC ćelija	54
4.1.8. Uticaj utišavanja ekspresije <i>MIF</i> gena u HTR-8/SVneo ćelijama na ekspresiju N-kadherina	54
4.2. Ispitivanje ekspresije MIF i drugih proinflamatornih citokina u odgovoru HTR-8/SVneo ćelija na tretman LPS	55
4.2.1. Uticaj LPS na vijabilnost i broj adherentnih HTR-8/SVneo ćelija	55
4.2.2. Uticaj LPS na ekspresiju proinflamatornih citokina MIF, IL6 i IL8 u HTR-8/SVneo ćelijama	56
4.3. Diferencijalna ekspresija MIF u ćelijskim linijama normalnog i maligno transformisanog trofoblata	58
4.3.1. Ekspresija <i>MIF</i> gena u HTR-8/SVneo ćelijama normalnog trofoblata i horiokarcinomskim JAr i Jeg-3 ćelijama	58
4.3.2. Ekspresija <i>CD74</i> i <i>CXCR2</i> gena u HTR-8/SVneo ćelijama normalnog trofoblata i horiokarcinomskim JAr i Jeg-3 ćelijama	58
4.3.3. Imunolokalizacija MIF u HTR-8/SVneo ćelijama normalnog trofoblata i horiokarcinomskim JAr i Jeg-3 ćelijama	59
4.3.4. Ekspresija MIF u HTR-8/SVneo ćelijama normalnog trofoblata i horiokarcinomskim JAr i Jeg-3 ćelijama	60
4.3.5. Subćelijska distribucija MIF u HTR-8/SVneo ćelijama normalnog trofoblata i horiokarcinomskim JAr i Jeg-3 ćelijama	60

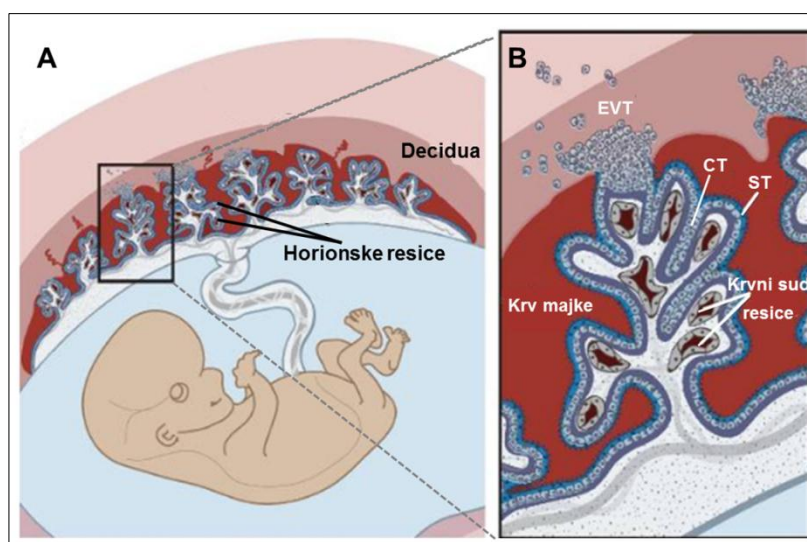
4.3.6. Nivo sekretovanog MIF u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija normalnog trofoblata i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelija	61
4.3.7. Uticaj antagoniste estrogenskih receptora Fulvestranta na sekreciju MIF od strane JAr ćelija	62
4.3.8. Ispitivanje molekulskih formi MIF u ukupnim ćelijskim lizatima HTR-8/SVneo ćelija normalnog trofoblata i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelija	63
4.3.9. Ispitivanje molekulskih formi MIF u subćelijskim frakcijama HTR-8/SVneo ćelija normalnog trofoblata i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelija	64
4.3.10. Ispitivanje molekulskih formi sekretovanog MIF u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija normalnog trofoblata i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelija	65
DISKUSIJA	67
ZAKLJUČCI	77
LITERATURA	80

UVOD

1.1. Placenta čoveka – građa i funkcija

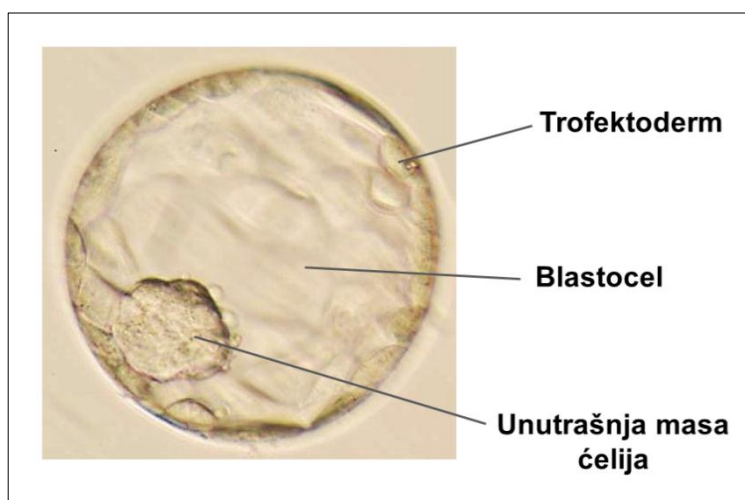
Placenta predstavlja visko specijalizovan privremeni organ koji obavlja niz funkcija neophodnih za pravilan rast i razvoj embriona i od kog u velikoj meri zavisi uspešan ishod trudnoće. Funkcionalno, placenta zamenjuje više organa fetusa. Celokupna fiziološka razmena materija između majke i ploda obavlja se preko placente – apsorpcija nutrijenata koji se dalje transportuju ka fetusu, ekskrecija fetalnih produkata metabolizma kao i razmena gasova. Placenta je i endokrini organ i sekretuje niz hormona koji regulišu metaboličke procese u organizmu majke i fetusa podržavajući trudnoću i pravilan razvoj ploda.

U toku razvoja placente, na spoljašnjem omotaču fetusa - horionu, razvijaju se **horionske resice** (lat. *villi*) koje predstavljaju osnovnu funkcionalnu i strukturnu jedinicu placente (**Slika 1**). Horionske resice vrlo brzo rastu i granaju se povećavajući kontaktnu površinu između tkiva majke i fetusa i u početnim stadijumima trudnoće prekrivaju celu površinu horiona. Kasnije, resice se granaju samo u onom delu horiona u kome će se obavljati intenzivna razmena materija između dva organizma. Ovaj deo horiona (lat. *chorion frondosum*) ostvaruje blizak kontakt sa **bazalnom deciduom** (lat. *decidua basalis*). Ostatak horiona na kome je došlo do degeneracije resica krajem prvog trimestra naziva se **glatki horion** (lat. *chorion laeve*) i okrenut je ka šupljini materice (1).



Slika 1. Shematski prikaz strukture placente. (A) Placenta i fetus u šestoj nedelji trudnoće. (B) Vilusno stablo. CT - citotrofoblast, ST - sinciotrofoblast, EVT - ekstravilusni trofoblast. (Modifikovano iz Zeldovich i Bakardijev, 2012 (2)).

Razvoj placente počinje implantacijom blastociste u zid uterusa a sam proces se naziva placentacija. Ključnu ulogu u ovim procesima imaju **ćelije trofoblasta**, specijalizovane ćelije placente koje su odgovorne za karakterističnu funkciju ovog organa. Nastaju diferencijacijom trofektoderma, spoljašnjeg sloja blastociste dok se od unutrašnje mase ćelija blastociste razvija embrion (**Slika 2**). Krajnje razvijena horionska resica sastoji se od trofoblastnog sloja koji potpuno prekriva površinu resice i centralnog dela koji je ispunjen vezivom i fetalnim krvnim sudovima (**Slika 1**).



Slika 2. Blastocista čoveka. (Modifikovano iz Lonergan i sar., 2007 (3)).

Trofoblast predstavlja deo placente koji je u neposrednom kontaktu sa tkivima majke. U direktnom je kontaktu sa majčinom krvlju i zajedno sa vezivom i endotelom fetalnih krvnih sudova horionske resice čini barijeru između krvi majke i krvi fetusa koje nikada ne dolaze u direktan kontakt (**Slika 1**). Sva razmena materija između dva organizma odvija se preko trofoblasta. Ovakva organizacija placente čoveka predstavlja **hemohorijalni** tip placente (1).

U okviru trofoblasta razlikujemo **sinciotrofoblast** i **citotrofoblast**. Ova dva tipa ćelija se razlikuju po građi i funkciji. Na površini horionske resice nalazi se **sinciotrofoblast** koji predstavlja višejedarnu protoplazmatičnu masu. Jedra su mala i nepravilnog oblika dok se u citoplazmi može uočiti veliki broj vakuola različite veličine. Preko sinciotrofoblata obavlja se transport svih materija između majke i fetusa (1).

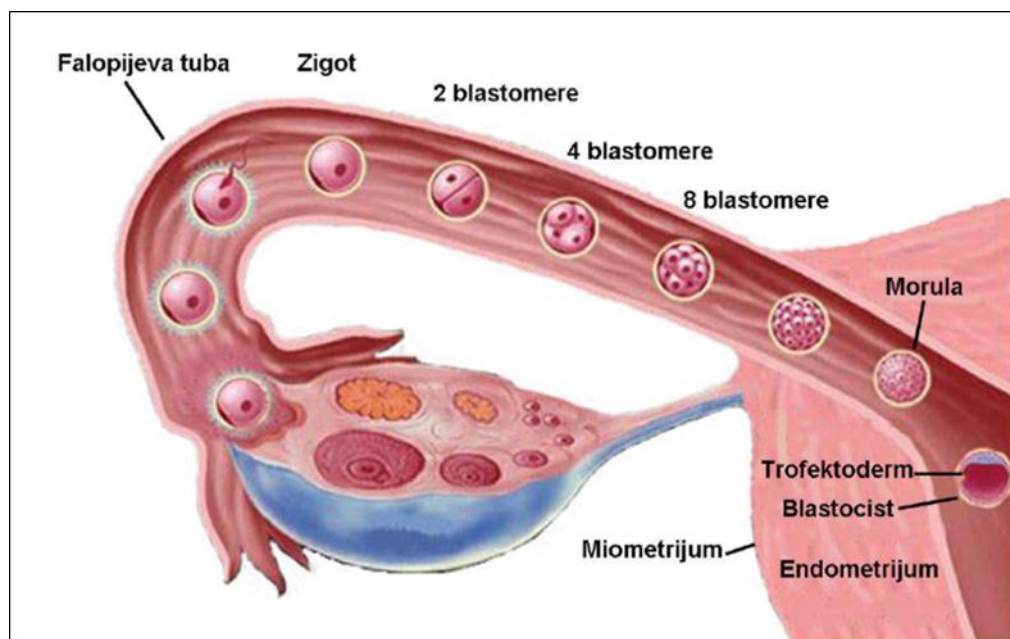
Citotrofoblast predstavlja prekursor svih ostalih populacija trofoblasta. Nalazi se neposredno ispod sinciotrofoblasta horionske resice i sačinjen je od jednog sloja poligonalnih ćelija sa krupnim euhromatskim jedrima. Deobom ćelija, citotrofoblast daje ćelije koje ostaju nediferencirane i mitotski aktivne kao i ćelije koje se dalje diferenciraju u druge tipove trofoblasta. Fuzijom citotrofoblastnih ćelija nastaje sinciotrofoblast dok procesom epitelo-mezenhimske tranzicije nastaju invazivne ćelije ekstravilusnog trofoblasta (1).

1.2. Stadijumi razvoja placente čoveka

1.2.1. Preimplantaciona faza

Oplođenje jajne ćelije čoveka događa se u ampularnom delu jajovoda 24 do 48 sati nakon ovulacije. Nastali **zigot** prolazi kroz proces brazdanja koji podrazumeva ubranu deobu oplodene jajne ćelije na međusobno jednake ćelije - blastomere. Kao rezultat brazdanja, oko trećeg dana od oplođenja nastaje **morula** – kompaktna loptasta struktura sačinjena od 12 do 16 ćelija. U prva tri do četiri dana od oplođenja embrion se pomoću kontrakcija jajovoda kreće ka materici u čiju šupljinu dospeva u stadijumu morule. Tokom blastomerizacije embrion je zaštićen opnom nazvanom *zona pellucida* koja sprečava njegovu adheziju za zidove jajovoda (4) (**Slika 3**).

Oko petog dana od oplođenja unutar morule se akumulira tečnost uzrokujući razmicanje blastomera i formiranje šuplje loptaste strukture – **blastociste**. U ovom stadijumu plod se sastoji od spoljašnjeg jednoslojnog **trofektoderma** koji okružuje **blastocel**, šupljinu blastociste ispunjenu tečnošću (4). Od trofektoderma razvije se najveći deo placente i deo ekstraembrionalnih struktura. Unutar blastociste se nalazi **unutrašnja masa ćelija** ili **embrioblast**, kompaktna grupa pluriopotentnih ćelija od kojih će se razviti embrion i deo ekstraembrionalnih struktura (4) (**Slika 2**). Pol blastociste na kojem se ispod sloja trofektoderma nalazi embrioblast naziva se embrionski pol.



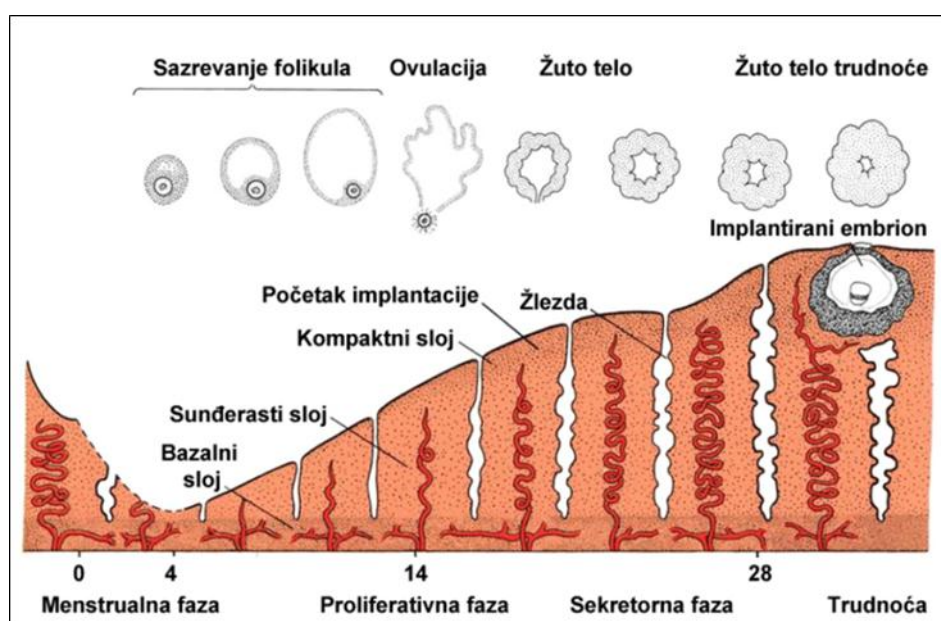
Slika 3. Rani stadijumi razvića embriona od oplodjenja do stadijuma blastociste. (Modifikovano iz Red-Horse i sar., 2004 (5)).

Tokom preimplantacionog perioda u endometriju uterusa majke takođe dolazi do mnogih promena koje imaju za cilj pripremu za implantaciju embriona. Za vreme **proliferativne faze** menstrualnog ciklusa (od 4. do 15. dana ciklusa od 28 dana) pod uticajem estrogena kojeg sekretuju granulosa ćelije rastućeg folikula dolazi do intenzivnog rasta endometrija koji se ogleda u proliferaciji stromalnih ćelija i razvoju žlezda (6) (**Slika 4**). Dva do tri dana nakon ovulacije (oko 17. dana ciklusa) nastupa **sekretorna faza** menstrualnog ciklusa koja je regulisana progesteronom poreklom iz žutog tela (lat. *corpus luteum*) (6) (**Slika 4**). U sekretornoj fazi ciklusa izražena je aktivnost žlezda endometrija, razvoj krvnih sudova, infiltracija urođenoubilačkih ćelija materice (eng. *natural killer cells*), proliferacija ćelija strome i diferencijacija stromalnih fibroblasta u sekretorne, **decidualne** ćelije. Ovaj proces se naziva **decidualizacija** i predstavlja pripremu endometrija za implantaciju (7). Proces decidualizacije endometrija se nastavlja nakon implantacije embriona pod uticajem faktora koje luči trofoblast i ima ulogu u stvaranju pogodne sredine za dalji razvoj placente (8).

Na početku sekretorne faze epitel endometrija nije prijemčiv za blastocistu i u ovom periodu ne može doći do implantacije. Apikalna površina epitela pokrivena je slojem glikoproteina koji je bogat mucinima, posebno mucinom 1 (MUC1),

transmembranskim glikoproteinom koji sprečava adheziju blastociste (9). Sredinom sekretorne faze (između 20. i 24. dana) dolazi do promena na epitelu endometrijuma koji postaje receptivan odnosno sposoban da pričvrsti blastocistu. Ovaj kratak period se naziva „**prozor implantacije**“ (6).

Ukoliko do implanacije ne dođe, nivo progesterona naglo opada i hipertrofirani deo endometrijuma nastao tokom prethodnih faza menstrualnog ciklusa se odlubljuje u vidu menstrualnog krvarenja. Ova faza ciklusa se naziva **menstrualna faza** (6).



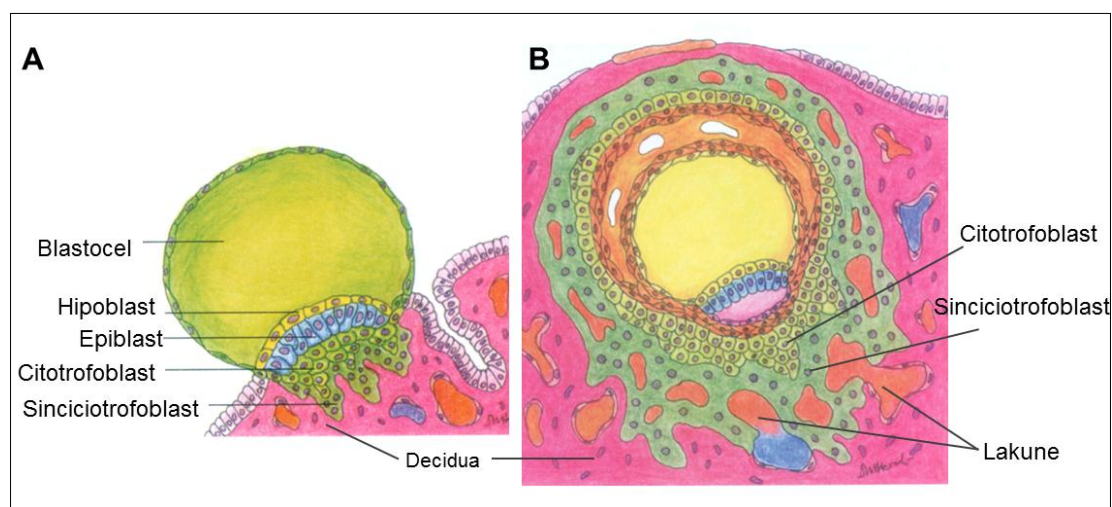
Slika 4. Promene u endometrijumu u toku menstrualnog ciklusa i ranoj trudnoći. (Modifikovano iz Sadler 2012 (6)).

1.2.2. Implantacija

Do implantacije blastociste u zid materice dolazi oko šestog dana nakon oplodjenja (4). Blastocista se oslobađa zone pelucide što omogućava njenu adheziju za zid uterusa i početak **implantacije**. Ovaj proces je podeljen u tri faze. U prvoj fazi implantacije nazvanoj **apozicija**, dolazi do nestabilne interakcije apikalnih membrana trofektoderma blastociste i epitelnih ćelija endometrijuma. Blastocista se ka zidu uterusa orijentiše svojim embrionalnim polom na kome se nalaze polarizovane trofektodermalne ćelije koje ispoljavaju mikrovile na svojoj apikalnoj membrani. Receptivna faza uterusa odlikuje se prisustvom membranskih izraštaja pinopoda na apikalnoj strani epitelnih ćelija endometrijuma kao i odsustvom MUC1 (4,9).

Sinhronizacija procesa sazrevanja blastocista i dostizanja faze receptivnosti uterusa neophodna je za uspešnost implantacije.

Nakon apozicije sledi **faza stabilne adhezije** ćelija trofektoderma i epitela endometrijuma nakon koje ubrzo nastupa **invazija** trofoblastnih ćelija kroz epitel i dalje kroz stromu decidualizovanog endometrijuma (**Slika 5A**). Oko dvanaestog dana od oplodjenja plod se nalazi potpuno u zidu materice a mesto implantacije je prekriveno obnovljenim slojem epitela endometrijuma (1).



Slika 5. Shematski prikaz razvika embriona čoveka. (A) Blastocista sedmi dan nakon oplodjenja - implantacija. (B) Embrion dvanaesti dan nakon oplodjenja - lakunarna placentna faza. (Modifikovano iz Nikolić 2007 (10)).

Tokom procesa adhezije trofektoderm proliferiše i diferencira se u trofoblast dajući dva tipa trofoblastnih ćelija - spoljašnji višejedarni sloj **ranog sinciotrofoblasta** koji naleže na ćelije **ranog citotrofoblasta**, jednojedarne, mitotički aktivne ćelije jasno definisanih membrana (1). U ovoj fazi razvoja placente sinciotrofoblast ispoljava invazivna svojstva, prodire između epitelnih ćelija endometrijuma, proteolitički razgrađuje bazalnu membranu i počinje da vrši eroziju strome uterusa. Sloj sinciotrofoblasta konstantno raste usled proliferacije i sincicijalizacije ćelija citotrofoblasta i oko dvanaestog dana od oplodnje prekriva celu površinu blastociste (1) (**Slika 5B**).

U regulaciji i sinhronizaciji razvoja blastociste i pripremi endometrijuma za implantaciju učestvuju niz faktora koje proizvode i rastuća blastocista i endometrijum stvarajući pogodnu sredinu za implantaciju i dalji razvoj placente (11). Pored steroidnih

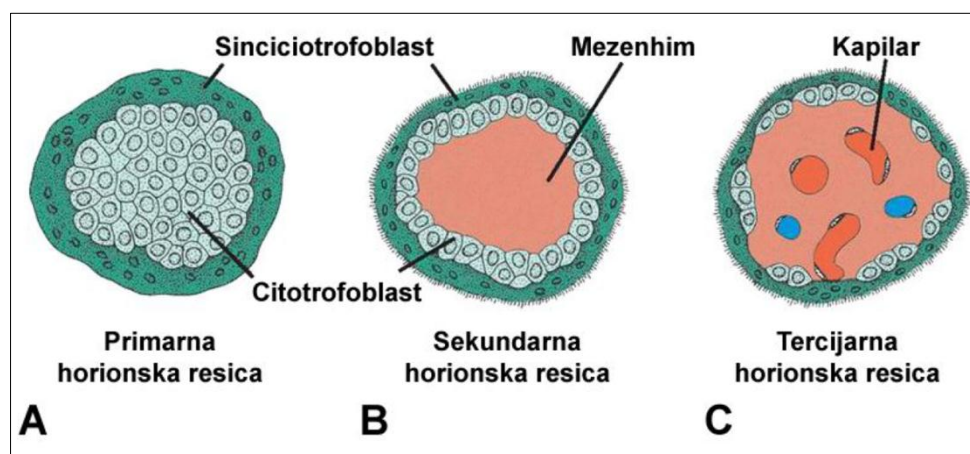
hormona koji regulišu ciklične promene endometrijuma važnu ulogu u ovim procesima imaju faktori rasta, proinflamatorni citokini, prostaglandini kao i adhezivni molekuli koji omogućavaju invaziju trofoblastnih ćelija i interakciju ćelija majke i fetusa (4,12,13). Na površini polarizovanih trofektodermalnih ćelija embrionalnog pola blastociste eksprimira se L-selektin koji se vezuje za svoje ugljenohidratne ligande ispoljene na površini receptivnih epitelnih ćelija učestvujući u početnoj interakciji blastociste i endometrijuma (14). Dalja adhezija i invazija trofoblastnih ćelija posredovana je, između ostalog, ekspresijom integrina na trofoblastnim ćelijama i sekrecijom matriksnih metaloproteinaza, enzima koji razgrađuju vanćelijski matriks (eng. *extracellular matrix* - ECM) (4).

1.2.3. Razvoj placente

Devetog dana nakon oplodjenja u sloju sinciciotrofoblasta pojavljuju se vakuole koje se daljim razvojem spajaju u veće prostore stvarajući lakune. Oko dvanaestog dana od oplodnje lakune se spajaju i formiraju lakunarnu mrežu koja se prostire kroz sloj sinciciotrofoblasta. Lakunarna mreža je spojena sa erodiranim kapilarima decidue tako da se majčina krv uliva u lakune. Ovaj period u razvoju placente naziva se **lakunarna faza** i predstavlja ranu fazu uspostavljanja uteroplacentne cirkulacije (1) (**Slika 5B**).

Krajem druge nedelje razvića formiraju se prve horionske resice i placenta ulazi u **ranu vilusnu fazu** koja traje sve do kraja četvrte nedelje trudnoće (1). U vreme formiranja prvih resica ekstraembrionalni mezenhim nalazi se ispod sloja citotrofoblasta i u potpunosti oblaže unutrašnjost horionske šupljine. Zajedno sa sinciciotrofoblastom, citotrofoblast i ekstraembrionalni mezenhim čine troslojnu **horionsku ploču**. Proliferacijom i prodiranjem citotrofoblasta u sloj sinciciotrofoblasta nastaju izbočine koje se nazivaju **primarne horionske resice** (**Slika 6A**). Lakunarna mreža prerasta u sistem **intervilusnih prostora** i potpuno je obložena sinciciotrofoblastom. U narednim danima razvića, citotrofoblast na vrhovima primarnih resica proliferiše stvarajući ćelijske stubove koji prodiru kroz sloj sinciciotrofoblasta sve do decidue. Daljom proliferacijom, citotrofoblastni ćelijski stubovi se bočno spajaju sa stubovima susednih resica formirajući spoljašnju **citotrofoblastnu ljusku**. Uporedo sa ovim procesom dolazi do proliferacije ekstraembrionalnog mezenhima koji zalazi u jezgro resica.

Ovako formirana **sekundarna horionska resica** sastoji se od spoljašnjeg sloja sinciotrofoblasta, unutrašnjeg sloja citotrofoblasta i centralnog dela kojeg čini vezivno tkivo (**Slika 6B**). Prva **vilusna stabla** nastaju grananjem sekundarnih resica čime se povećava površina koja je u kontaktu sa majčinom krvlju. Polovinom treće nedelje trudnoće u mezenhimskom jezgru formiraju se prvi kapilari diferencijacijom mezenhimskih ćelija. Ovako građena struktura naziva se **tercijarna horionska resica** i predstavlja krajnji stupanj u njihovom razvoju (1) (**Slika 6C**). Kapilari resica rastu i povezuju se sa krvnim sudovima koji nastaju u mezenhimu horionske ploče uspostavljajući krvni sistem placente. U četvrtoj nedelji trudnoće, kada i srce embriona počinje da kuca, placentni krvni sudovi povezani su preko pupčane vrpce sa krvnim sistemom embriona čineći jedinstven cirkulatorni sistem (1). Tokom trudnoće konstantno se razvijaju nove horionske resice i njihov razvoj prolazi kroz pomenute razvojne stupnjeve.



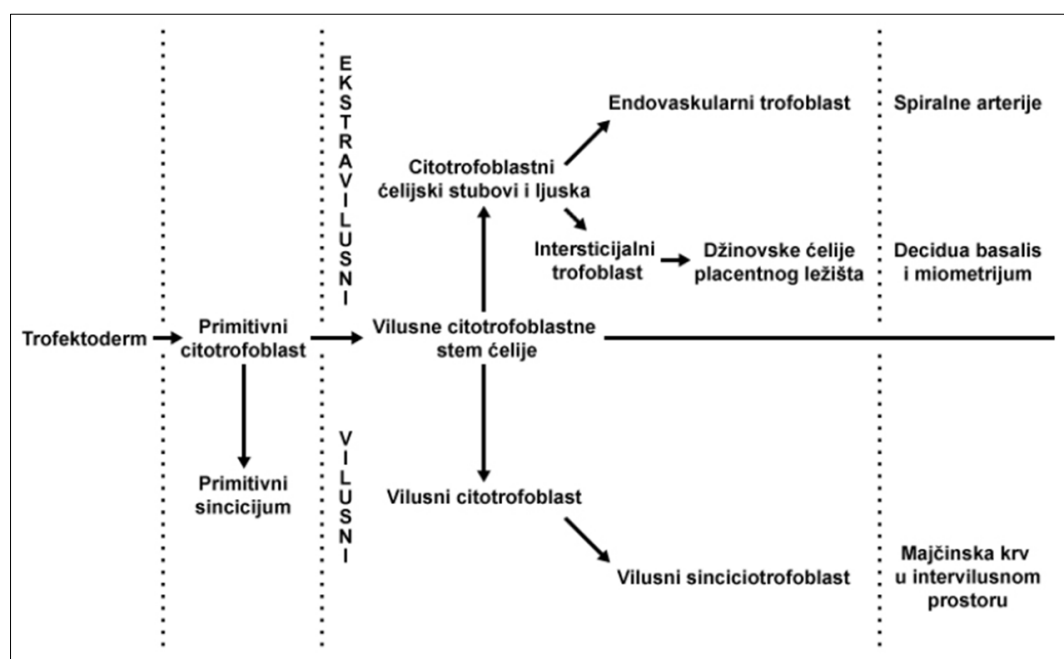
Slika 6. Razviće horionskih resica. Shematski prikaz poprečnog preseka primarne (A), sekundarne (B) i terciarne horionske resice (C). (Modifikovano iz Sadler, 2012 (6)).

Nastala citotrofoblastna ljuska potpuno pokriva sloj trofoblasta i pričvršćuje horion za deciduu (6). Jasna granica između endometrijuma i trofoblasta se gubi. Ćelije citotrofoblasta zajedno sa decidualnim ćelijama, stromom decidue, ostacima žlezda endometrijuma, uteroplacentalnim krvnim sudovima i fibrinoidom, specifičnim vanćelijskim matriksom, formira **bazalnu ploču** koja predstavlja zonu interakcije tkiva majke i fetusa (1). Resice koje se protežu od horionske do bazalne ploče pričvršćujući placentu za endometrijum nazivaju se **sidreće resice**. Na vrhovima ovih resica nalaze se citotrofoblastni ćelijski stubovi čije distalne ćelije poprimaju invazivna svojstva i

prodiru u tkivo decidue. Od bočnih strana sidrećih resica odvajaju se resice koje slobodno plivaju u intervillusnim prostorima ispunjenim majčinom krvlju i nazivaju se **plivajuće resice**. Njihovu površinu prekriva sinciotrofoblast i preko njih se obavlja razmena materija između majke i fetusa (1).

1.3. Diferencijacija ekstravilusnog trofoblasta

Trofektoderm se tokom implantacije diferencira u prve primitivne linije trofoblasta koje se uporedo sa razvojem embriona dalje diferenciraju dajući više populacija trofoblastnih ćelija (**Slika 7**). Citotrofoblast koji se nalazi u unutrašnjosti sidrećih i plivajućih resica diferencira se duž dva glavna pravca dajući međusobno funkcionalno različite populacije ćelija - **vilusni** i **ekstravilusni trofoblast**.



Slika 7. Shematski prikaz diferencijacije trofoblasta. (Modifikovano iz Loke i King, 1995 (15)).

Vilusni citotrofoblast predstavlja sloj ćelija koje naležu na bazalnu membranu sidreće resice. Ovaj sloj čine jednojedarne nediferencirane ćelije koje u toku trudnoće konstantno proliferišu i diferencijacijom daju sinciotrofoblast i ostale populacije trofoblasta (1) (**Slika 8**).

Trofoblast koji gradi strukture van horionskih resica naziva se **ekstravilusni trofoblast (EVT)**. Ova populacija ćelija obuhvata trofoblastne ćelije koje ulaze u sastav glatkog horiona, horionske i bazalne ploče, placentnih septi kao i ćelijska ostrvca koja predstavljaju agregate trofoblastnih ćelija i ekstraćelijskog matriksa fibrinoida (1).

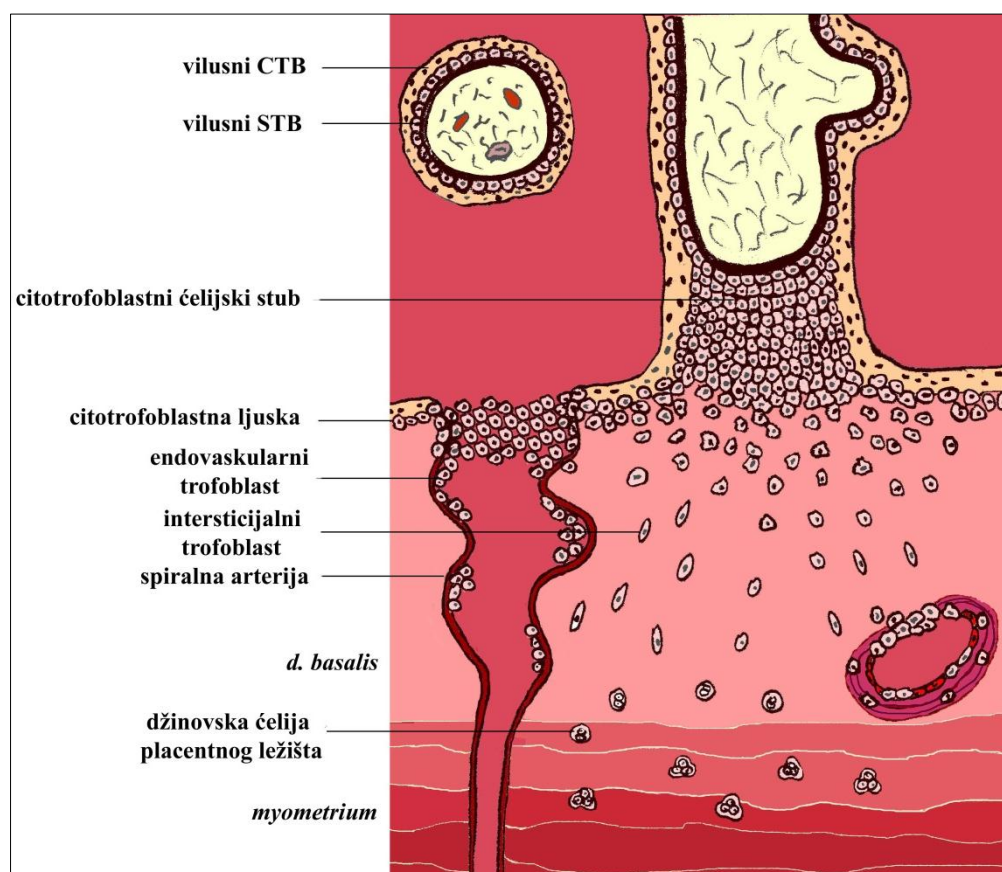
Duž ćelijskih stubova sidrećih resica, posmatrajući od proksimalnog kraja bližeg fetusu ka distalnom kraju koji je u kontaktu sa deciduom, ćelije se postepeno diferenciraju ka invazivnom fenotipu prolazeći kroz proces epitelo-mezenhimske tranzicije (16). Citotrofoblastne ćelije koje naležu na bazalnu membranu sidreće resice su epitelnog tipa, mitotski su aktivne i njihovom proliferacijom se izdužuje ćelijski stub (17). U središnjim delovima ćelijskih stubova primećuju se ćelije prelaznog tipa koje prestaju da se dele, postepeno gube epitelni fenotip i poprimaju invazivna svojstva. Na distalnim krajevima stubova trofoblastne ćelije su potpuno diferencirane u invazivni fenotip, odvajaju se od resica i vrše invaziju u deciduu (16). Ove ćelije eksprimiraju integrine karakteristične za invazivne ćelije i sekretuju matriksne metaloproteinaze koje vrše razgradnju ECM (17–20).

Invazivne trofoblastne ćelije u stromi decidue predstavljaju **intersiticijalni EVT (iEVT)**. Ove ćelije vrše invaziju duboko u tkivo decidue i do kraja osme nedelje trudnoće prodiru sve do prve trećine miometrijuma. Invazivnost iEVT ćelija postepeno se smanjuje što se više udaljavaju od sidrećih resica. Na granici između endometrijuma i miometrijuma uočavaju se krupne, okrugle, višejedarne ćelije bez invazivnih svojstava pod nazivom **džinovske ćelije placentnog ležišta** koje predstavljaju krajnji stupanj diferencijacije iEVT (1) (**Slika 8**). Tokom invazije, iEVT interakcijom sa decidualnim stromalnim ćelijama, makrofagima i decidualnim urođenoubilačkim ćelijama (eng. *decidual natural killer cells* - dNK) reguliše imunski odgovor majke obezbeđujući prihvatanje i opstanak semialogenog fetusa (21,22).

Tokom prvih nedelja trudnoće EVT ćelije se akumuliraju na otvorima decidualnih spiralnih arterija i formiraju **trofoblastne čepove** (23). Ove strukture sprečavaju dotok majčine krvi stvarajući hipoksične uslove u intervilusnim prostorima (23). Uporedo sa stvaranjem trofoblastnih čepova, EVT vrši invaziju u žlezde endometrijuma čiji se produkti sekretuju u intervilusne prostore omogućavajući **histotrofnu ishranu** fetusa do uspostavljanja pune uteroplacentne cirkulacije (24–26). Od šeste nedelje trudnoće postepeno se formiraju otvori u trofoblastnim čepovima,

povećava se protok majčine krvi do placente i raste parcijalni pritisak kiseonika u intervilusnim prostorima (23,27).

Trofoblastne ćelije koje dolaze u kontakt sa lumenom spiralnih arterija uterusa nazivaju se **endovaskularni EVT (vEVT)** (Slika 8). Ove ćelije retrogradno migriraju duž lumena spiralnih arterija zalazeći sve do prve trećine miometrijalnih segmenata. U toku prvog trimestra, vEVT remodeluje zidove ovih krvnih sudova dovodeći do degradacije sloja glatkih mišića i endotela. Kao rezultat ovog procesa nastaju krvni sudovi koji ne odgovaraju na vazokonstrikciju, širokog su promera i konstantno dopremaju velike količine krvi do placente (27). U procesu remodelovanja, EVT ćelije poprimaju endotelni fenotip i zamenjuju endotelne ćelije spiralnih arterija (28). Takođe, EVT ćelije vrše invaziju u vene i limfne sudove decidue (29,30). Smatra se da je uloga ovog procesa u drenaži krvne plazme iz intervilusnog prostora (29).



Slika 8. Populacije trofoblasta na mestu implantacije. (Autor ilustracije - Milica Jovanović Krivokuća)

Krajem prvog trimestra, uporedo sa remodelovanjem spiralnih arterija, trofoblastni čepovi u potpunosti nestaju i uspostavlja se puna uteroplacentna cirkulacija karakteristična za potpuno formiranu **hemohorijalnu placentu** čoveka (27,31). Početni stadijumi razvića placente i fetusa, sve do kraja prvog trimestra, odvijaju se u hipoksičnim uslovima (32). Utvrđeno je da parcijalni pritisak kiseonika ima ulogu u regulaciji diferencijacije trofoblasta (33,34). Hipoksični uslovi u prvom trimestru trudnoće pospešuju angiogenezu i doprinose razvoju placente u celini (35).

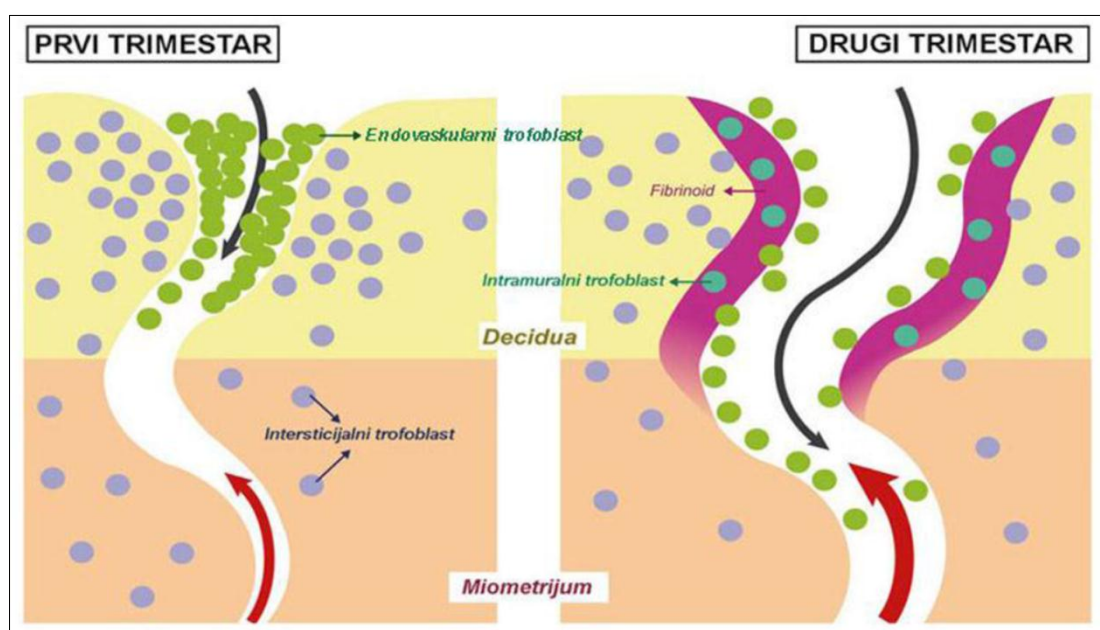
1.4. Remodelovanje decidualnih spiralnih arterija

Remodelovanje spiralnih arterija predstavlja jedan od ključnih procesa za uspešan ishod trudnoće. Prošireni krvni sudovi koji nastaju kao rezultat ovog procesa obezbeđuju stalni dotok velikih količina krvi bogate kiseonikom i nutrijentima koji su neophodni za pravilan rast i razvoj fetusa. Takođe, dotok krvi do placente ovako proširenim krvnim sudovima optimalne je brzine i pritiska čime se sprečava oštećenje horionskih resica u intervulusnim prostorima. Potpuno remodelovane spiralne arterije uočavaju se krajem prvog trimestra trudnoće (27). Ozbiljna patološka stanja u trudnoći kao što su preeklampsija, intrauterini zastoje rasta ploda, prevremeni porođaji i pobačaji u kasnijoj trudnoći povezani su sa nepotpunom transformacijom spiralnih arterija i plitkom invazijom trofoblasta u stromu decidue (36–38).

Remodelovanje spiralnih arterija nastaje kao rezultat zajedničkog delovanja ćelija EVT i imunskih ćelija decidue (39–41). U ranoj trudnoći, decidualni makrofagi i dNK ćelije se infiltriraju u zidove spiralnih arterija decidue i pod njihovim uticajem dolazi do prvih promena (39). U endotelu spiralnih arterija stvaraju se vakuole dok u sloju glatkih mišića ovih krvnih sudova dolazi do dezorganizacije i hipertrofije mišićnih ćelija (27). Decidualni makrofagi i dNK ćelije učestvuju u privlačenju iEVT, njihovom akumuliranju oko zidova spiralnih arterija kao i u razlaganju aretrijskog ECM (27). iEVT vrši invaziju kroz degradirani vaskularni zid i u toku ovog procesa diferencira se u vEVT koji dalje migrira retrogradno duž lumena spiralnih arterija dospevajući sve do miometrijalnih segmenata. vEVT nastavlja dalju degradaciju vaskularnih zidova (**Slika 9**). Menjajući repertoar adhezivnih molekula koje ispoljava, vEVT poprima endotelna svojstva (28,42) što omogućava interakciju sa endotelom spiralnih arterija. vEVT se

integriše u sloj endotela i dalje vrši invaziju u vaskularni zid. Takođe, interakcija ova dva tipa ćelija dovodi do apoptoze i potpunog nestajanja endotela vaskularnog zida koji biva zamenjen ćelijama vEVT (27,43,44). U kasnijim stadijumima trudnoće dolazi do obnavljanja endotela spiralnih arterija (27) (**Slika 9**).

Proces remodelovanja spiralnih arterija obuhvata gubitak sloja glatkih mišića i degradaciju elastičnog arterijskog ECM. Glatke mišićne ćelije se dediferenciraju ili se procesom apoptoze potpuno gube (40) a fibrinoidni matriks kojeg deponuju trofoblastne ćelije u potpunosti zamenjuje elastični ECM (27). Ćelije trofoblasta koje su uronjene u fibrinoidni matriks nazivaju se **intramuralni trofoblast** (27).



Slika 9. Shematski prikaz procesa remodelovanja spiralnih arterija u prvom trimestru (levo) i drugom trimestru (desno). (Modifikovano iz Pijnenborg i sar., 2006 (27)).

1.5. Medijatori trofoblastne invazije

Invazivni ekstravilusni trofoblast nastaje kao rezultat procesa epitelo-mezenhimske tranzicije (EMT) (16). U ovom procesu citotrofoblastne ćelije postepeno gube svojstva epitelnih ćelija, prestaju da se dele, izdužuju se i diferenciraju u ćelije invazivnog kapaciteta (16). Ove promene uočavaju se u ćelijskim stubovima sidrećih resica. Posmatrajući ćelijski stub od dela bližeg resici ka distalnom delu koji je u kontaktu sa deciduom ćelije postepeno gube epitelni a zadobijaju invazivni fenotip.

Invazija ćelija obuhvata razgradnju ECM pomoću proteaznih enzima i migraciju ćelija kroz ovako razgrađeni ECM (45). Pomoću integrina ćelije se specifično vezuju za komponente ECM što dalje, reorganizacijom citoskeleta i aktivacijom signalnih puteva, promoviše invaziju ćelija (46,47). Na molekulskom nivou, EMT obuhvata promenu repertoara integrina eksprimiranih na površini trofoblastnih ćelija, promenu matriksnih metaloproteinaza i komponenti ECM sekretovanih od strane trofoblastnih ćelija (18–20,48).

Integrini su transmembranski glikoproteini koji posreduju u kontaktu ćelija sa ECM. Sastoje se od dve različite nekovalentno vezane subjedinice i predstavljaju receptore koji se specifično vezuju za komponente ECM. Razlikujemo više tipova α i β integrinskih subjedinica i od njihove kombinacije zavisi receptorska specifičnost. Ćelije invazivnog i neinvazivnog tipa se međusobno razlikuju po ekspresiji integrina i po komponentama ECM koji sekretuju (48). Promena repertoara integrina na površini trofoblastnih ćelija putem koje dolazi do promene proliferativnog fenotipa ka invazivnom naziva se **integrinsko prekopčavanje** (20). Na bazalnoj strani vilusnih citotrofoblastnih ćelija koje se nalaze uz mezenhimsko jezgro horionskih resica, visoko je eksprimiran integrin $\alpha_6\beta_4$ kojim se ove ćelije vezuju za laminin u bazalnoj membrani (17,48,49). Kod proksimalnih ćelija sidreće resice uočava se smanjen nivo ekspresije $\alpha_6\beta_4$ integrina i ekspresija integrina $\alpha_5\beta_1$, receptora za fibronektin (17,48,49). Takođe, kod ovih ćelija povećava se i ekspresija fibronektina tako da je ECM proksimalnih delova sidreće resice bogat ovim glikoproteinom (48). Idući ka distalnim krajevima ćelijskih stubova uočava se postepeno povećanje ekspresije integrina $\alpha_5\beta_1$ i $\alpha_1\beta_1$, receptora za laminin i kolagen tipa I i IV, dok se nivo ekspresije $\alpha_6\beta_4$ integrina smanjuje (17,48,49) Kod invazivnih EVT ćelija ekspresija $\alpha_6\beta_4$ integrina se u potpunosti gubi (48,49).

U toku diferencijacije trofoblastnih ćelija ka invazivnom fenotipu dolazi do promene u ekspresiji i drugih adhezivnih molekula. **Kadherini** predstavljaju grupu transmembranskih glikoproteina koji učestvuju u formiranju međućelijskih veza (50). **E-kadherin** je karakterističan za epitelne ćelije. Visoko je eksprimiran kod vilusnog trofoblasta dok se ekspresija ovog adhezivnog molekula smanjuje kod ćelija koje prolaze kroz EMT. Potpuno diferencirane, invazivne EVT ćelije vrlo slabo eksprimiraju E-kadherin (20,51). Sa druge strane, ekspresija **N-kadherina** karakteristična je za

mezenhimske ćelije i promoviše njihova migratorna i invazivna svojstva (52). Povećana ekspresija N-kadherina pokazana je kod različitih tipova malignih ćelija (53,54). Invazivni EVT eksprimira N-kadherin i ovaj adhezivni molekul posreduje u procesu trofoblastne invazije (55). Takođe, pokazano je da N-kadherin promoviše adheziju kancerskih ćelija za endotel krvnih sudova (56). Multhaup i saradnici su utvrdili da N-kadherin učestvuje u interakciji trofoblastnih i endotelnih ćelija *in vitro* ukazujući na moguću važnost ovog adhezivnog molekula u diferencijaciji trofoblasta ka endotelnom fenotipu i u procesu remodelovanja spiranih arterija (42).

Invazivni EVT koji vrši transformaciju spiralnih arterija prolazi kroz proces epitelo-endotelne tranzicije (28). U ovom procesu repertoar adhezivnih molekula menja se ka endotelnom fenotipu. Pokazano je da vEVT ćelije ekspimiraju **VE-kadherin**, **PECAM-1**, **VCAM-1** i **integrin $\alpha_4\beta_1$** (28,57). Za invazivni trofoblast karakteristična je i ekspresija integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ za koje je pokazano da posreduju u adheziji trofoblastnih ćelija za endotelne ćelije *in vitro* (58). Epitelo-endotelna tranzicija koja obuhvata ekspimiranje endotelnih adhezivnih molekula omogućava interakciju trofoblastnih i endotelnih ćelija koja dalje vodi ka transformaciji spiralnih arterija, procesu neophodnom za uspešan ishod trudnoće.

Matriksne metaloproteinaze (MMP) predstavljaju heterogenu grupu Zn-zavisnih endopeptidaza koje razlažu komponente ECM. Ovi enzimi imaju bitnu ulogu u invaziji ćelija i uključeni su u mnoge fiziološke i patološke procese. Većina MMP se izlučuje van ćelije u formi proenzima a u regulaciji njihove aktivnosti učestvuju **tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMP)**. MMP razlažu sve komponente ECM i prema supstratu dele se na želatinaze (MMP2, MMP9), kolagenaze (MMP1, MMP8, MMP13) i stromelizine (MMP3, MMP7, MMP10, MMP11, MMP12). Membranske MMP (MMP14, MMP15, MMP16) učestvuju u aktivaciji MMP2 s obzirom na to da je supstrat ovih enzima neaktivna proMMP2 forma. Trofoblastne ćelije ekspimiraju niz MMP i TIMP a *in vitro* ispitivanjima je pokazano da najveći značaj za proces trofoblastne invazije imaju MMP2 i MMP9 (18,19,59,60).

Proces EMT je karakterističan za kancerogenezu a invazija trofoblasta u mnogome podseća na invaziju malignih ćelija (45). Međutim, trofoblastna invazija je strogo kontrolisan proces, vremenski i prostorno je ograničen. U regulaciji trofoblastne invazije učestvuje niz molekula koje sekretuju ćelije i tkiva u zoni interakcije majke i

fetusa. Promena u ekspresiji i sekreciji regulatornih molekula pod uticajem različitih faktora može poremetiti procese trofoblastne invazije i transformacije spiralnih arterija uzrokujući različita patološka stanja u trudnoći koja mogu ostaviti posledice po zdravlje majke i deteta i nakon porođaja odnosno rođenja.

1.6. Infekcija i trofoblast

Neadekvatna placentacija i promena u funkciji placente dovode do različitih komplikacija u trudnoći. Jedan od faktora koji značajno doprinose promeni funkcije EVT i placente jeste prisustvo infekcije u ranoj trudnoći i povezano je sa pojavom ranih spontanih pobačaja, razvojem preeklampsije i intrauterinog zastoja rasta ploda (61,62). Takođe, infekcija u kasnijim fazama trudnoće dovodi se u vezu sa prevremenom rupturom fetalnih membrana i prevremenim porođajem (63). Mehanizmi koji povezuju infekciju sa poremećajem funkcije placente nisu još uvek dovoljno objašnjeni.

U normalnoj trudnoći mogu se razlikovati tri imunološke faze (64). Prvi trimestar i rani drugi trimestar predstavljaju proinflamatornu imunološku fazu. U drugom trimestru dolazi do ubrzanog rasta i razvoja ploda i preovladava antiinflamatorno stanje. Ponovna aktivacija imunskog sistema majke nastaje u trećem trimestru trudnoće kada proinflamatorno okruženje u uterusu pomaže otpočinjanju porođaja. Za uspešnost trudnoće neophodno je visoko usaglašeno funkcionisanje imunskog sistema majke i placente.

Implantacija embriona i proces placentacije odvijaju se u proinflamatornom okruženju. Čelije urođenog imunskog sistema majke povećano se infiltriraju u deciduu u toku prvog trimestra i akumuliraju oko trofoblasta koji vrši invaziju u tkivo uterusa (64). Povećana je produkcija proinflamatornih citokina kao i drugih molekula koji učestvuju u regulaciji funkcije trofoblasta od strane imunokompetentnih ćelija ali i drugih neimunskih ćelija koje su prisutne u zoni interakcije majke i fetusa kao što su trofoblast i decidualne stromalne ćelije. Proces invazije trofoblasta regulišu mnogi proinflamatorni citokini, poput faktora nekroze tumora α (TNF- α), interferona γ (IFN- γ), interleukina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, faktora inhibicije migracije makrofaga (60,65–69). Trofoblast aktivno regrutuje makrofage i dNK ćelije, stimuliše ih da produkuju faktore koji dalje regulišu invaziju trofoblasta kao i angiogenezu u decidui (41,64,70). Takođe,

decidualni makrofagi i dNK ćelije učestvuju u procesu degradacije zidova spiralnih arterija (39).

Infekcija unutar materice u trudnoći dovodi do dodatnog aktiviranja imunokompetentnih ćelija majke i indukovanja imunskog odgovora protiv patogena. Takođe, ćelije trofoblasta eksprimiraju receptore slične Tollu (eng. *Toll-like receptors* - TLR) pomoću kojih mogu i same prepoznati prisustvo patogena i produkcijom proinflamatornih citokina doprineti imunskom odgovoru i zaštiti od infekcije (71). Međutim, narušavanje kontrolisanog proinflamatornog stanja u decidui i poremećaj kompleksnih interakcija ćelija trofoblasta i imunskog sistema majke dovode do poremećaja funkcije placente i do razvoja komplikacija koje se mogu ispoljiti i u kasnijim fazama trudnoće.

1.7. Horiokarcinom

Gestacioni horiokarcinom predstavlja tumor koji nastaje malignom transformacijom trofoblastnih ćelija i spada u gestacione trofoblastne bolesti (72). Može se javiti u toku ili nakon trudnoće, nakon namernog prekida trudnoće a najčešće nakon pojave hidatidiformne mole, stanja koje karakteriše hiperplazija trofoblasta i formiranje horionskih resica sa mnogobrojnim cistama (72). U Evropi i Severnoj Americi javlja se sa učestalošću od 1:40 000 trudnoća dok je u Aziji i Africi učestalost veća (72). Mada dobro odgovara na tretman, horiokarcinom predstavlja jedan od najmalignijih tumora čoveka, veoma je invazivan i veoma brzo metastazira najčešće u pluća, mozak i jetru ali se metastaze mogu naći i u karlici, vagini, gastrointestinalnom traktu, bubrezima i slezini (72). Veoma je vaskularizovan i uzrokuje obilna i česta krvarenja.

Histološki, horiokarcinom čine ćelije sinciciotrofoblasta i citototrofoblasta ali organizacija u horionske resice izostaje (73). Tumor produkuje humani horionski gonadotropin tako da praćenje nivoa ovog hormona u serumu pacijentkinja predstavlja pouzdan parametar za uspostavljanje dijagnoze, praćenje toka bolesti i uspešnosti tretmana (73).

Molekulski mehanizmi koji se nalaze u osnovi nastanka horiokarcinoma kao i toka bolesti su vrlo slabo istraženi.

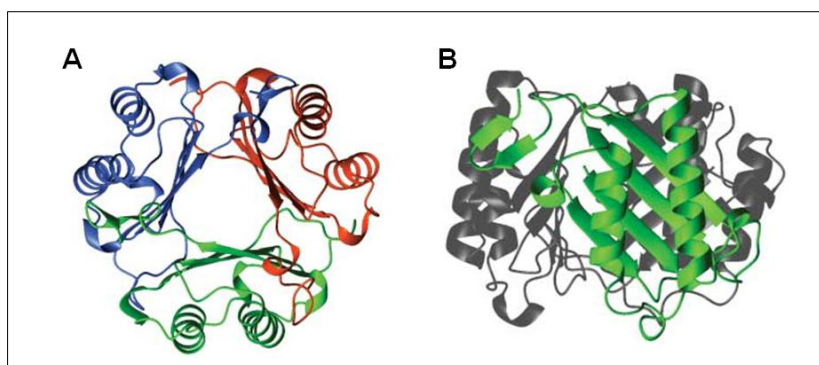
1.8. Faktor inhibicije migracije makrofaga (MIF)

Faktor inhibicije migracije makrofaga (eng. *macrophage migration inhibitory factor* - MIF) je multifunkcionalni protein koji je eksprimiran u mnogim tkivima čoveka. Prvi put je opisan kao citokin aktiviranih T-ćelija koji inhibira migraciju makrofaga po čemu je i dobio ime (74,75). MIF je jedan od prvih identifikovanih citokina. Istraživanja narednih decenija pokazala su da pored citokinske uloge MIF može delovati i kao enzim, hormon i šaperon kao i da ima ulogu u različitim fiziološkim i patološkim procesima (76–78).

1.8.1. MIF - gen i protein

U genomu čoveka *MIF* gen se nalazi se na hromozomu 22 (22q11.2) (79). Dužine je oko 1 kb i sastoji se iz tri egzona i dva introna (80). DNK sekvenca *MIF* gena je evolutivno visoko konzervirana među kičmenjacima ali se takođe može naći i kod artropoda, nematoda, protozoa pa čak i kod biljaka (81). Karakteristično za *MIF* gen čoveka je da je poznat samo jedan transkript, iRNK dužine od oko 800 nukleotida (80).

MIF protein se sastoji od 115 amino kiselina i njegova molekulska težina iznosi oko 12.5 kDa (82). Fiziološki aktivna forma MIF proteina je homotrimer (83). Monomeri su međusobno povezani na takav način da formiraju centralni kanal u proteinu (83) (**Slika 10**).



Slika 10. Struktura MIF proteina - homotrimer. (A) Pogled na protein odozgo. (B) Pogled na protein sa strane. (Modifikovano iz Calandra i Roger, 2003 (84)).

MIF ispoljava **enzimsku aktivnost** - katalizuje *in vitro* tautomerizaciju D-dopahroma, nefiziološkog supstrata, u odgovarajući indolni derivat (5,6-dihidroksiindol-2-karboksilna kiselina – DHICA) (85). Aktivno mesto enzima se nalazi u hidrofobnom džepu između dve subjedinice homotrimeru (86). S obzirom na to da fiziološki supstrat nije poznat, biološka uloga tautomerazne aktivnosti MIF kod čoveka i ostalih kičmenjaka nije jasna. Smatra se da predstavlja predačku karakteristiku s obzirom na to da je MIF visoko evolutivno konzerviran protein. Međutim, pokazano je da inhibicija tautomerazne aktivnosti malim molekulima koji se vezuju za aktivno mesto dovodi i do inhibicije nekih bioloških funkcija MIF (69,87,88). ISO-1 ((*S,R*)-3-(4-hidroksifenil)-4,5-dihidro-5-izoksazol metil acetat) jedan je od najčešće korišćenih inhibitora tautomerazne aktivnosti MIF (87). Pokazano je da mehanizam inhibicije bioloških funkcija MIF malim inhibirajućim molekulima nije direktno vezan za inhibiciju tautomerazne aktivnosti već da njihovo vezivanje za katalitičko mesto onemogućava interakciju MIF sa receptorima ili nekim drugim proteinskim partnerima bitnim za njegovu funkciju (89).

Takođe, MIF ispoljava i tiol-protein oksidoreduktaznu aktivnost. Aktivno mesto enzima čine četiri amino kiseline, Cys-Ala-Leu-Cys (CALC), koje se nalaze od 57. do 60. mesta u polipeptidnom lancu MIF (90). Ovaj CXXC motiv karakterističan je za enzime slične tioredoksinu čija je katalitička aktivnost zasnovana na formiranju i raskidanju disulfidnih mostova pomoću dva cisteinska ostatka. Ova enzimska aktivnost omogućava MIF da učestvuje u regulaciji redoks procesa u ćeliji i može imati ulogu u interakciji MIF i njegovih proteinskih partnera.

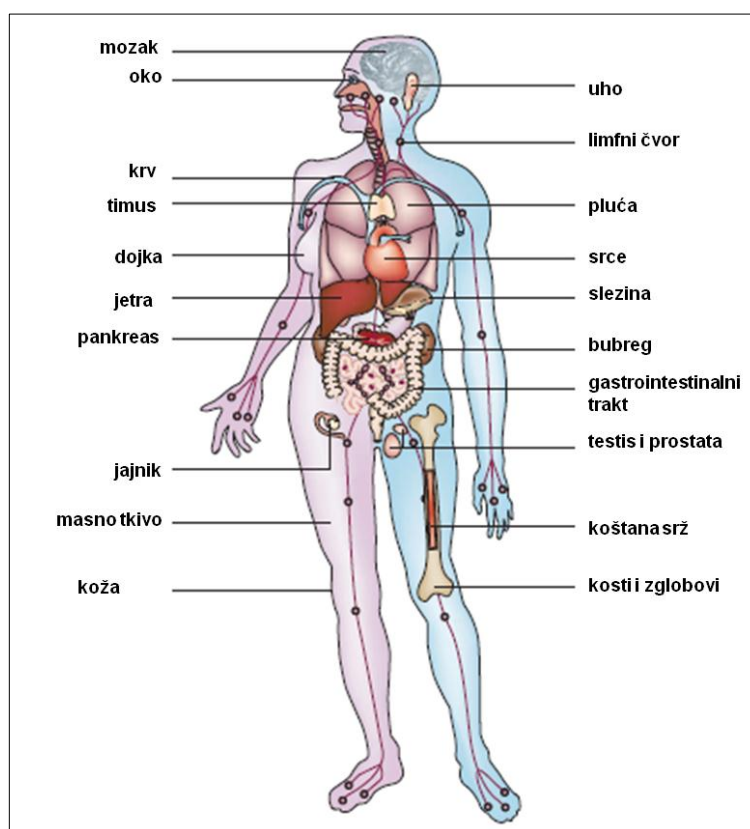
Pre nekoliko godina otkrivena je još jedna enzimska funkcija MIF. Pokazano je da MIF može delovati i kao nukleaza i da učestvuje u programiranoj ćelijskoj smrti partanatosu (91).

1.8.2. Ekspresija i sekrecija MIF

MIF je eksprimiran u različitim tipovima ćelija kao što su epitelne, endotelne, ćelije imunskog sistema, ćelije adenohipofize i druge (92–98). Detektovan je u skoro svim organskim sistemima čoveka (99–102) (**Slika 11**). MIF je konstitutivno eksprimiran (96,103) i uglavnom je skladišten u citoplazmi (91,97,98) ali se može

detektovati i u jedru ćelija (91,101,104). Sekretija iz preformiranih citoplazmatskih rezervi a ujedno i stimulacija ekspresije MIF regulisane su nizom faktora kao što su lipopolisaharid (94,103), TNF- α (96,105), glukokortikoidni hormoni (106,107) i hipoksija (108).

Na N-terminalnom kraju MIF proteina nema signalne sekvence (109) koja u klasičnom putu sekrecije usmerava proteine od endoplazmatičnog retikuluma preko Goldžijevog kompleksa do sekretornih vezikula. Pokazano je da monociti čoveka sekretuju MIF nekonvencionalnim putem pomoću ABCA1 proteina, člana familije membranskih ABC transportera (eng. *ATP-binding cassette transporter protein*) (110). U sekreciji MIF ovim putem posreduje p115 protein koji učestvuje u transportu preko membrane (111). MIF se u citoplazmi vezuje za p115 protein i pod dejstvom stimulusa zajedno se transportuju van ćelije (111).



Slika 11. Shematski prikaz ekspresije MIF u tkivima čoveka. (Modifikovano iz Calandra i Roger, 2003 (84))

1.8.3. Receptori za MIF

MIF može ispoljavati svoje dejstvo na autokrini i parakrini način. Biološke funkcije ostvaruje vezujući se za četiri receptora: CD74, CXCR2, CXCR4 i CXCR7 (112–114).

CD74 (eng. *cluster of differentiation 74*) je membranski protein čija intracelularna forma poznata pod nazivom nepromenljivi lanac (eng. *invariant chain* - Ii) učestvuje u formiranju i transportu MHC molekula klase II (115). CD74 obavlja receptorsku funkciju nakon vezivanja MIF koji predstavlja njegov jedini poznati ligand pored D-dopahrom tautomeraze, proteina koji ima sličnu strukturu i funkciju kao i MIF (116). Za dalju aktivaciju signalnih puteva nakon vezivanja MIF neophodno je da se ostvari kompleks između CD74 i ko-receptorskog proteina CD44 (117). Ovako formirani kompleks aktivira Src protein kinazu koja dalje aktivira signalne kaskade preko ERK1/2 mitogenom aktivirane protein (MAP) kinaze, fosfatidilinozitol-3 kinaze i protein kinaze B (117–119).

Vezivanje MIF za CD74 takođe aktivira i internalizaciju ovog receptora (116). Nakon endocitoze u endzomu se pomoću proteaza odvaja intracelularni domen CD74 koji se dalje otpušta u citoplazmu i kasnije premešta u jedro gde putem interakcije sa NFκB transkripcionim faktorom aktivira transkripciju antiapoptotskog *BCL2L1* gena (120,121).

MIF predstavlja neklasičan ligand hemokinskih receptora CXCR2, CXCR4 i CXCR7 (113,114). Homologija MIF i klasičnih liganada ovih receptora, IL-8 (CXCR2) i faktora produkovanog od strane tromalnih ćelija (eng. *stromal cell-derived factor* - SDF-1) (CXCR4, CXCR7) je niska. Međutim, MIF u svojoj sekvenci sadrži motive koji su odgovorni za interakciju sa navedenim hemokinskim receptorima što omogućava vezivanje i dalje aktiviranje signalnih puteva u ćeliji (122–124). MIF se direktno vezuje za CXC receptore ali za ostvarivanje bioloških funkcija značajno je i stvaranje signalnih kompleksa CD74/CXCR2, CD74/CXCR4 i CD74/CXCR4/CXCR7 (113,114,125). Vezujući se za hemokinske receptore MIF pokreće signalne puteve preko G_iα proteina aktivirajući ERK1/2 MAP kinaze i protein B kinazu (114,125).

1.8.4. Biološke funkcije MIF

MIF kao multifunkcionalni protein ima značajnu ulogu u mnogim fiziološkim i patološkim procesima. Fokus istraživanja funkcije MIF u početku je bio usmeren na njegovu citokinsku aktivnost i proinflamatornu i imunomodulatornu ulogu. MIF je jedan od ključnih modulatora imunskog odgovora i inflamacije. Direktno ili indirektno stimuliše ekspresiju velikog broja proinflamatornih citokina kao što su TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 (95,106,126). Takođe, MIF stimuliše i ekspresiju aktivatora inflamacije - azot oksida (NO), cikooksigenaze 2 (COX-2), prostaglandina E2 (PGE2) (109,127).

MIF deluje i kao hormon adenohipofize koji reguliše aktivnost glukokortikoida. Sintetiše se u kortikotropnim i tireotropnim ćelijama adenohipofize odakle se luči pod uticajem kortikotropin-oslobađajućeg hormona usled infekcije i drugih stresnih stimulusa (98,103).

MIF ispoljava antagonistički efekat sa glukokortikoidima koji deluju imunosupresivno i antiinflamatorno dok fiziološke koncentracije ovih hormona indukuju ekspresiju i sekreciju MIF (106). Takođe, praćenjem nivoa MIF u serumu zdravih ljudi utvrđeno je da MIF ima cirkadijalni ritam sekrecije (128). Maksimalne koncentracije MIF su izmerene u jutarnjim časovima što se poklapa sa maksimumom sekrecije kortizola (128). Uzajamna modulacija aktivnosti MIF i glukokortikoida ima ulogu u uspostavljanju adekvatnog imunskog odgovora organizma.

Pored citokinske, hormonske i ranije pomenute enzimske aktivnosti pokazano je da MIF deluje i kao šaperon sprečavajući agregaciju proteina nakon toplotnog šoka (129). Za amiotrofičnu lateralnu sklerozu je karakteristično prisustvo nepravilno savijenog mutantnog oblika superoksid dismutaze koji se akumulira na mitohondrijama i endoplazmatičnom retikulumu. MIF inhibira ovaj proces obavljajući šaperonsku aktivnost (130).

MIF stimuliše proliferaciju i migraciju ćelija (69,131,132), deluje antiapoptotski tako što inhibira aktivaciju apoptoze zavisne od p53 (133,134). MIF indukuje ekspresiju i sekreciju angiogenih faktora kao što su bazni faktor rasta fibroblasta (eng. *basic fibroblast growth factor* – bFGF), vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor* – VEGF) i IL-8 i na taj način stimuliše angiogenezu (132,135). Takođe, MIF učestvuje u regrutaciji leukocita na mesto inflamacije u svim

fazama ovog procesa koji uključuje hemotaksu leukocita, njihovo kotrljanje po zidu krvnog suda, adheziju leukocita i endotelnih ćelija i dalju migraciju leukocita kroz sloj endotela krvnog suda do mesta inflamacije (113,119,136). Indukujući ekspresiju adhezivnih molekula MIF učestvuje u regulaciji interakcije leukocita i endotela (119,136).

MIF je važan medijator u patogenezi mnogih bolesti. Povezan je sa nastankom i razvojem sepse i septičkog šoka, autoimunskih i kardiovaskularnih bolesti (76,78,103,137). Pokazano je da MIF ima značajnu ulogu u nastanku i razvoju kancera kao i da doprinosi razvoju metastaza (77).

1.8.5. MIF i kancerogeneza

Nekontrolisano deljenje ćelija, stimulacija angiogeneze, supresija imunskog odgovora, invazivnost i metastaziranje predstavljaju značajne karakteristike kancera (138). Hronična inflamacija je povezana sa nastankom i razvojem kancera i utvrđeno je da citokini imaju važnu ulogu u ovim procesima. MIF kao multifunkcionalni citokin ima značajnu ulogu u svim fazama razvoja kancera.

Za većinu ispitivanih malignih tumora karakteristična je povećana ekspresija MIF u tumorskom tkivu a kod nekih je povećana i ekspresija MIF receptora (77). Takođe, kod pacijenta obolelih od različitih tipova kancera uočava se povećan nivo MIF u serumu što korelira sa stadijumom bolesti, razvojem metastaza i prognozom bolesti (139,140). MIF stimuliše proliferaciju tumorskih ćelija i promoviše njihovo preživljavanje inhibirajući apoptozu (141,142). Takođe, MIF promoviše infiltraciju imunosupresivnih ćelija u tumor inhibirajući imunski odgovor protiv maligno transformisanih ćelija (143).

Rast i veličina tumora su vezani ne samo za proliferaciju kancerskih ćelija već zavise i od razvoja krvnih sudova u tumoru. MIF ima značajnu ulogu i u tumorskoj angiogenezi i na taj način dodatno doprinosi rastu malignog tumora. Pokazano je da inhibicija MIF primenom specifičnih antitela dovodi do smanjenog razvoja mikrocirkulacije u tumoru i kao posledica toga dolazi do smanjenja samog tumora (144,145). MIF stimuliše ekspresiju i sekreciju angiogenih faktora VEGF i IL-8 u kancerskim ćelijama i na taj način doprinosi neovaskularizaciji tumora (146,147). Rast

malignog tumora i tumorska angiogeneza regulisani su hipoksičnim uslovima. Naime, rastom tumora, ćelije koje su na periferiji sve više bivaju u hipoksiji što stimuliše ekspresiju hipoksijom indukovano faktora 1 α (eng. *hypoxia inducible factor 1 α* - HIF-1 α), proteina koji dalje stimuliše ekspresiju angiogenih faktora i stvaranje novih krvnih sudova (148). MIF učestvuje dvojako u regulaciji angiogeneze putem HIF-1 α . Hipoksični uslovi i HIF-1 α stimulišu ekspresiju MIF koji dalje stimuliše ekspresiju angiogenih faktora (149). Takođe, MIF stabilizuje sam HIF-1 α protein doprinoseći njegovoj aktivnosti (150).

MIF učestvuje i u formiranju metastaza (151). Stvaranje tumorskog tkiva na mestu udaljenom od primarnog tumora obuhvata procese razgradnje ECM, odvajanja kancerskih ćelija od primarnog tumora i njihovu invaziju kroz okolna tkiva do krvnog sistema kojim dospevaju na nova mesta u organizmu i stvaraju sekundarne tumore. MIF stimuliše invaziju i migraciju mnogih tipova kancerskih ćelija (152–155). Povećana ekspresija MIF u ćelijama tumora dovodi do smanjenja ekspresije E-kadherina što slabi međusobne veze ćelija i promovise EMT (156,157). Takođe, MIF stimuliše ekspresiju MMP, omogućavajući invaziju i migraciju tumorskih ćelija kroz okolna tkiva (158).

1.8.6. MIF u trudnoći

MIF je široko zastupljen u reproduktivnom sistemu žene. Detektovan je u tkivu ovarijuma (granuloza ćelije), folikularnoj tečnosti i u endometrijumu tokom menstrualnog ciklusa (epitel žlezda endometrijuma, stromalne ćelije) (99,100). Takođe, MIF je široko prisutan i u tkivima zone interakcije majke i fetusa u toku trudnoće. U decidui MIF eksprimiraju stromalne ćelije (100) dok je u placenti MIF detektovan pretežno u ćelijama vilusnog i ekstravilusnog citotrofoblasta (92). Najviši nivo ekspresije MIF u tkivu placente je utvrđen u ranoj trudnoći (108). Pri kraju prvog trimestra nivo ekspresije MIF u placenti opada nakon čega ostaje konstantan do kraja trudnoće (108).

Ekspresiju MIF u placenti reguliše parcijalni pritisak kiseonika (108). Utvrđeno je da hipoksični uslovi stimulišu ekspresiju i sekreciju MIF što je pokazano u *in vitro* uslovima korišćenjem eksplanata placente prvog trimestra. U prvom trimestru trudnoće razvoj placente se odvija u hipoksičnim uslovima sve dok ne dodje do potpunog

remodelovanja spiralnih arterija i uspostavljanja punog protoka krvi između majke i fetusa krajem prvog trimestra (27). Pad nivoa ekspresije MIF u tkivu placente pri kraju prvog trimestra podudara se sa porastom parcijalnog pritiska kiseonika u placenti.

Letta i saradnici su pokazali da 17β -estradiol (E_2) u *in vitro* uslovima reguliše sekreciju MIF u placenti prvog trimestra (159). E_2 dozno zavisno smanjuje sekreciju MIF ali ne utiče na promenu nivoa ekspresije *MIF* iRNK i proteina u eksplantima placente prvog trimestra. Pokazano je da E_2 smanjuje ekspresiju ABCA1 membranskog transportnog proteina (159) koji je uključen u sekreciju MIF (110) i da na taj način ostvaruje uočene efekte.

Tokom trudnoće serumska koncentracija MIF značajno je viša nego kod žena koje nisu u drugom stanju (160). Odstupanje od fiziološkog nivoa MIF u serumu trudnica dovodi se u vezu sa pojavom određenih patoloških stanja kao što su spontani pobačaji i preeklampsija (161,162). Utvrđeno je da koncentracija MIF u amnionskoj tečnosti raste pred porođaj bivajući i nekoliko puta viša od koncentracije tokom trudnoće (163). S obzirom na to da se nivo serumskog MIF ne menja smatra se da je povećanje koncentracije MIF lokalno budući da je MIF detektovan u amnionskim epitelnim ćelijama. Smatra se da MIF doprinosi proinflamatornom okruženje koje je karakteristično za stanje pred porođaj (163).

1.8.7. MIF i funkcija placente

Istraživanja naše grupe pokazala su da bi MIF, kao faktor decidualnog porekla, mogao učestvovati u regulaciji migracije i invazije trofoblata čoveka *in vitro*. Farmakološka inhibicija tautomerazne aktivnosti MIF pomoću ISO-1 dovela je do smanjenja migratornih i invazivnih sposobnosti trofoblata dok je egzogeno dodati MIF stimulisao ove procese (69). Dodatak ISO-1 je smanjivao stimulatívno dejstvo kondicioniranih medijuma decidualnih stromalnih ćelija na invaziju trofoblata. U uslovima hemijski indukovane apoptoze kao i u *in vitro* uslovima stresa izazvanog hipoksijom i naknadnom reoksigenacijom, pokazano je da MIF štiti ćelije trofoblata od prekomerne apoptoze (164). MIF je uključen u regulaciju imunoprivilegije u zoni interakcije tkiva mlike i fetusa (165) kao i u odgovor placente na infekciju parazitom *Toxoplasma gondii* (166,167).

Dosadašnji podaci o ulozi MIF u trudnoći ukazuju na značaj ovog proteina za procese implantacije, placentacije i toka trudnoće međutim njegova specifična uloga i mehanizmi delovanja nisu još uvek u potpunosti objašnjeni. Dalja ispitivanja značaja ovog multifunkcionalnog proteina za trofoblast čoveka u fiziološkim i patološkim stanjima mogla bi doprineti proširivanju znanja u oblasti reproduktivne biologije, čemu je posvećen i ovaj rad.

CILJ ISTRAŽIVANJA

Na osnovu podataka iz literature o ulozi MIF u fiziološkim i patološkim procesima koji su važni za proces placentacije i trudnoću, opravdano je pretpostaviti da je do sada rasvetljen samo deo uloge koju MIF ima u regulaciji funkcije placente čoveka. Ovaj rad je posvećen ispitivanju značaja endogenog MIF za funkciju trofoblasta čoveka kao i ispitivanju uloge MIF u infekciji i trofoblastnim neoplazijama.

Na osnovu prethodno navedenog, postavljeni su sledeći neposredni ciljevi istraživanja:

- **Ispitivanje značaja endogenog MIF za funkcionalna svojstva trofoblasta čoveka *in vitro***
 - Ispitivanje uticaja na invaziju trofoblasta
 - Ispitivanje uticaja na ekspresiju proteina značajnih za proces trofoblastne invazije
 - Ispitivanje uticaja na diferencijaciju trofoblasta ka endovaskularnom fenotipu
 - Ispitivanje uticaja na funkcionalna svojstva endovaskularnog trofoblasta
- **Ispitivanje ekspresije MIF u odgovoru trofoblasta na infekciju**
- **Ispitivanje diferencijalne ekspresije i sekrecije MIF u ćelijskim linijama normalnog i maligno transformisanog trofoblasta**

MATERIJAL I METODE

3.1. Čelijska kultura

Za istraživanja u ovom radu korišćene su trofoblastne čelijske linije čoveka: imortalizovana čelijska linija normalnog ekstravilusnog trofoblata prvog trimestra HTR-8/SVneo i horiokarcinomske čelijske linije JAr i Jeg-3. Takođe, za ispitivanja integracije trofoblata u endotelni monosloj korišćene su primarne endotelne ćelije izolovane iz vene pupčanika čoveka (eng. *human umbilical vein endothelial cells* - HUVEC).

3.1.1. Čelijska kultura HTR-8/SVneo trofoblastne čelijske linije

Trofoblastna čelijska linija HTR-8/SVneo dobijena je ljubaznošću Charles H. Grahama (Queen's University, Kingston, ON, Kanada). Ova čelijska linija nastala je imortalizacijom primarnih ćelija normalnog ekstravilusnog trofoblata prvog trimestra putem transfekcije SV40 T antigenom (168). HTR-8/SVneo ćelije pokazuju fenotipske karakteristike ekstravilusnih trofoblastnih ćelija od kojih su nastale (168) što omogućuje primenu ove čelijske linije u istraživanjima funkcije trofoblata. U ovom radu HTR-8/SVneo ćelije su korišćene u ispitivanju značaja endogenog MIF za funkciju trofoblata čoveka *in vitro*, u ispitivanju ekspresije MIF u odgovoru trofoblata na tretman lipopolisaharidom (LPS) i u ispitivanju diferencijalne ekspresije MIF u čelijskim linijama normalnog i maligno transformisanog trofoblata.

HTR-8/SVneo ćelije su gajene u RPMI 1640 medijumu (Gibco, UK) koji je sadržao 5% (ispitivanje odgovora trofoblata na LPS tretman) odnosno 10% temperaturno inaktiviranog fetalnog telećeg seruma (eng. *fetal calf serum* - FCS) (Sigma, SAD) (ostala ispitivanja) i 1% rastvora antibiotika i antimikotika - 100 U/ml penicilina G, 100 µg/ml streptomycin sulfata i 0.25 µg/ml amfotericina B (Capricorn Scientific, Nemačka) što predstavlja kompletni RPMI medijum. Ćelije su gajene u vlažnoj atmosferi pri temperaturi od 37 °C, u 5% CO₂.

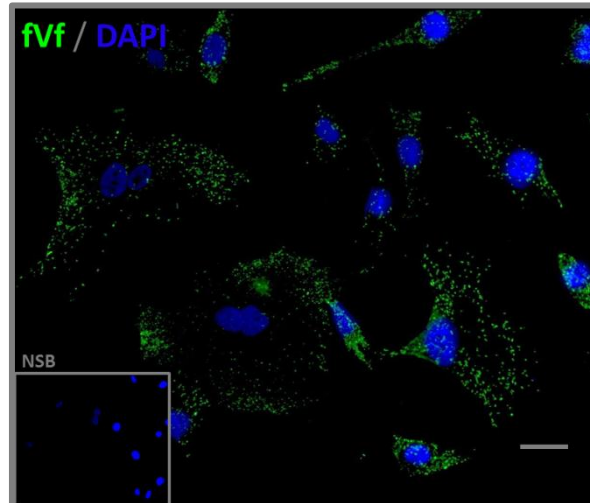
Za ispitivanje uticaja LPS (LPS, *Escherichia coli* 055:B5, Sigma-Aldrich Co., SAD) na ekspresiju MIF i drugih proinflamatornih citokina HTR-8/SVneo ćelije su tretirane 0.1, 1 i 10 µg/ml LPS 24 h u kompletnom RPMI medijumu. Nakon tretmana ćelije su lizirane za potrebe kvantitativne PCR i Western blot analize.

3.1.2. Čelijska kultura horiokarcinomskih čelijskih linija JAr i Jeg-3

U ovom radu horiokarcinomske čelijske linije JAr i Jeg-3 korišćene su u ispitivanju diferencijalne ekspresije MIF u normalnom i malignom trofoblastu. JAr čelijska linija nabavljena je od ATCC (American Type Culture Collection, SAD) dok je Jeg-3 nabavljena od ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures, UK). Ove čelijske linije su održavane u DMEM/F12 medijumu (Sigma, SAD) koji je sadržao 10% FCS i 1% rastvora antibiotika i antimikotika (kompletni DMEM medijum) u vlažnoj atmosferi pri temperaturi od 37 °C, u 5% CO₂.

3.1.3. Čelijska kultra endotelnih ćelija izolovanih iz vene pupčanika čoveka (HUVEC)

HUVEC su izolovane iz vena pupčanika sakupljenih posle normalnih terminskih porođaja (5 individualnih pupčanka; odobreno od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije, broj: 57/10). Nakon sakupljanja, vene pupčanika su ispirane fosfatnim puferom (eng. *phosphate buffered saline* - PBS) bez Ca²⁺ i Mg²⁺ od ostataka krvi nakon čega je vena ispunjavana rastvorom 0.05% tripsina (Torlak, Srbija) i 0.02% EDTA (etilendiamintetrasirćetna kiselina, eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*) 5 puta po 2 minuta prema opisanoj proceduri (169). Sakupljene ćelije gajene su u pločama i flaskovima za čelijsku kulturu koje su oblagane 0.2% želatinom u M199 medijumu (Lonza, Belgija) koji je sadržao 20% FCS, 2 mM L-Glutamina (Torlak, Srbija), 0.4% suplementa za rast endotelnih ćelija sa dodatim heparinom (PromoCell GmbH, Nemačka) i 1% rastvora antibiotika i antimikotika (HUVEC medijum) u vlažnoj atmosferi pri temperaturi od 37 °C, u 5% CO₂. Posle drugog pasaža čistoća HUVEC kulture je bila 92.5% a utvrđena je imunofluorescentnim bojenjem antitelom na fon Vilebrandov faktor (Dakopatts a/s, Danska) (**Slika 12**). U eksperimentima su korišćene HUVEC od drugog do sedmog pasaža.



Slika 12. Ekspresija fon Vilebrandovog faktora u kulturi primarnih HUVEC nakon drugog pasaža. Imunofluorescentno bojenje HUVEC na fon Vilebrandov faktor (fVf, zeleno). Jezra su bojena 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI, plavo). Nespecifično bojenje (NSB) je predstavljeno u donjem levom uglu slike. Veličina podeoka 100 µm.

3.1.4. Priprema kondicioniranih medijuma za ispitvanje sekrecije MIF

HTR-8/SVneo, JAr i Jeg-3 ćelije zasejane su u bunare ploče od 24 mesta, 3×10^5 ćelija po bunaru, u kompletnom RPMI odnosno DMEM medijumu (horiokarcinomske linije). Sledećeg dana, ćelije su isprane 2 puta PBS puferom i dodat je RPMI 1640 odnosno DMEM/F12 medijum (horiokarcinomske linije) bez seruma. Nakon 24 h inkubacije kondicionirani medijumi su sakupljeni, centrifugirani na 300 xg radi odstranjivanja ostataka ćelija i supernantanti su čuvani na -20°C do korišćenja u eksperimentima.

Za ispitivanja uticaja Fulvestranta, kompetitivnog antagoniste estrogenskih receptora, na sekreciju MIF kod JAr ćelija, 3×10^5 ćelija po bunaru je zasejano u ploču od 24 mesta u kompletnom RPMI medijumu. Narednog dana ćelije su isprane PBS puferom i dodat je tretman u RPMI 1640 medijumu bez fenol crvenog (Gibco, UK) i bez seruma. Medijum bez fenol crvenog korišćen je s obzirom na to da ovo jedinjenje pokazuje aktivnost sličnu estrogenu (170). Ćelije su tretirane 100 nM i 1000 nM Fulvestrantom rastvorenim u etanolu (Sigma, SAD) dok je kontrolna grupa tretirana 0.01% etanolom. Nakon 24 h inkubacije kondicionirani medijumi su sakupljeni i tretirani na isti način i čuvani po iznad opisanoj proceduri.

Za ispitivanje uticaja LPS na sekreciju MIF, HTR-8/SVneo ćelije su tretirane 0.1, 1 i 10 µg/ml LPS 24 h u RPMI 1640 medijumu bez dodatog seruma. Nakon tretmana, kondicionirani medijumi su sakupljeni i tretirani na isti način i čuvani po iznad opisanoj proceduri.

3.2. Transfekcija HTR-8/SVneo ćelija malim interferirajućim RNK

Značaj endogenog MIF za funkciju trofoblasta čoveka ispitivan je *in vitro* pomoću utišavanja ekspresije *MIF* u HTR-8/SVneo ćelijama transfekcijom malim interferirajućim RNK (eng. *small interfering ribonucleic acid* - siRNA). Ćelije su transfekovane pomoću lipofektamina (Lipofectamine RNAiMAX, Invitrogen, SAD) specifičnom siRNA za *MIF* iRNK (Silencer Select Validated siRNA, s8780) i negativnom kontrolnom siRNA (*Silencer* Negative Control siRNA #2, AM4613) nabavljenim od proizvođača Ambion (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD). HTR-8/SVneo ćelije su zasejane u ploče za ćelijsku kulturu od 24 mesta (u eksperimentima sa dužinom transfekcije od 48 h zasejano je 2×10^5 , a za eksperimente sa dužinom transfekcije od 72 h 1.5×10^5 ćelija po bunaru) odnosno u ploče od 6 mesta za analizu na protočnom citofluorimetru (u eksperimentima sa dužinom transfekcije od 48 h zasejano je 8×10^5 , a za eksperimente sa dužinom transfekcije od 72 h 7×10^5 ćelija po bunaru) u kompletnom RPMI medijumu. Narednog dana ćelije su isprane dva puta PBS puferom i dodata je smeša siRNA i lipofektamina u Opti-MEM medijumu sa redukovanim sadržajem seruma i bez antibiotika (Opti-MEM I GLUTAMAX I Reduced Serum Medium, Gibco, UK) prema uputstvu proizvođača (Lipofectamine RNAiMAX, Invitrogen, SAD). Za transfekciju u ovom radu korišćena je 30 nM siRNA i 0.25% lipofektamin u finalnoj koncentraciji.

Uspostavljene su tri eksperimentalne grupe ćelija - **L** - ćelije tretirane samo lipofektaminom, **S** - ćelije transfekovane negativnom kontrolnom siRNA i **siMIF** - ćelije transfekovane specifičnom siRNA za *MIF* iRNK. Za dalja ispitivanja, transfekovane HTR-8/SVneo ćelije su sakupljane nakon 48 h ili 72 h od transfekcije.

3.3. Imunofluorescentno bojenje ćelija

U Petrijeve šolje prečnika 65 mm u kojima su postavljena pokrovna stakla, zasejane su HTR-8/SVneo, JAr i Jeg-3 ćelije, 6×10^5 ćelija po Petrijevoj šolji, u odgovarajućem kompletnom medijumu. Nakon 24 h, ćelije su isprane jednom PBS puferom, osušene i fiksirane 5 min ledeno hladnim acetom-metanolom (1:1), ponovo osušene i čuvane na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do bojenja.

Prilikom bojenja, ćelije su prvo rehidratirane u PBS puferu i nespecifično vezivanje je blokirano 1% kazeinom 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, ćelije su inkubirane sa primarnim antitelom na MIF (MAB289, R&D Systems, UK) rastvorenim u 1% kazeinu preko noći na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon ispiranja PBS puferom ćelije su inkubirane sa sekundarnim anti-mišjim IgG AlexaFluor 488 antitelom 30 min na sobnoj temperaturi u mraku. Pokrovna stakla su nakon ispiranja sekundarnog antitela montirana Vectashield montirajućim medijumom koji je sadržao 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vector Laboratories, SAD) koji boji jedra u plavo. Kontrole za nespecifično vezivanje sekundarnog antitela inkubirane su u 1% kazeinu bez primarnog antitela.

HUVEC ćelije su gajene na pokrovnim staklima obloženim 0.2% želatinom u pločama od 24 mesta u HUVEC medijumu. Fiksiranje i bojenje ćelija je obavljeno prema opisanom protokolu korišćenjem primarnih antitela na fon Vilebrandov faktor (Dakopatts a/s, Danska) i sekundarnih anti-kunić IgG antitela AlexaFluor 488. Primarna i sekundarna antitela koja su korišćena i njihova razblaženja prikazana su u **Tabeli 3 i 4**.

Dobijeni preparati slikani su na fluorescentnom Carl Zeiss Axio Imager.A1 mikroskopu AxioCam MRm kamerom (Carl Zeiss, Nemačka).

3.4. Određivanje broja vijabilnih i adherentnih ćelija (MTT i Crystal violet test)

MTT i Crystal violet test su korišćeni za određivanje uticaja LPS na vijabilnost i broj adherentnih HTR-8/SVneo ćelija. U bunare ploče od 96 mesta zasejano je 2×10^4 HTR-8/SVneo ćelija po bunaru u 100 μl kompletnog RPMI medijuma. Narednog dana ćelije su isprane PBS puferom i inkubirane 24 h u kompletnom RPMI medijumu ili bez dodatog seruma sa LPS tretmanom. Ćelije su tretirane 0.1, 1 ili 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS.

Vijabilnost ćelija određena je MTT testom ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazol bromid, Sigma, SAD ili Acros Organic, SAD) (171). Nakon tretmana ćelije su ispirane PBS puferom i inkubirane 2 h na 37 °C u 100 µl rastvora MTT (1 mg/ml) u 10% FCS/PBS. Rastvor MTT je uklanjan, a u svaki bunar je dodavano po 100 µl 1-propanola (Lach:Ner, Czech Republic). Nakon rastvaranja istaložene boje merena je optička gustina na 540 nm na čitaču za mikrotitarske ploče (LKB, Austrija). Dobijenoj srednjoj vrednosti za kontrolnu grupu dodeljena je vrednost 100% i rezultati su predstavljeni kao procenat u odnosu na kontrolu. Eksperimenti su urađeni dva puta u šest ponovaka.

Broj adherentnih ćelija je određen Crystal violet testom. Nakon tretmana i ispiranja PBS puferom, ćelije su osušene i 5 min fiksirane ledeno hladnim aceton-metanolom (1:1) nakon čega su bojene 0.05% rastvorom boje Crystal violet (Sigma, SAD) u 25% metanolu tokom 5 min (50 µl/bunar). Višak boje ispiran je vodom nakon čega su ploče sušene na sobnoj temperaturi. Inkorporirana boja rastvarana je 0.1 M Na-citratom u 50% etanolu (100 µl/bunar) nakon čega je optička gustina merena na 540 nm. Dobijenoj srednjoj vrednosti za kontrolnu grupu dodeljena je vrednost 100% i rezultati su predstavljeni kao procenat u odnosu na kontrolu. Eksperimenti su urađeni dva puta u šest ponovaka.

Za određivanje vijabilnosti i broja adherentnih HUVEC ćelija pod uticajem kondicioniranog medijuma HTR-8/SVneo ćelija kod kojih je utišana ekspresija *MIF*, HUVEC ćelije su zasejane u bunare ploče od 96 mesta koji su oblagani 0.2% želatinom (2×10^4 ćelija/bunar) u 100 µl HUVEC medijuma. Narednog dana medijum je zamenjen mešavinom kondicioniranog medijuma transfekovanih HTR-8/SVneo ćelija sakupljenog 72 h nakon transfekcije i HUVEC medijuma u odnosu 2:1 (100 µl/bunar). Za MTT test, nakon 24 h inkubacije dodato je 10 µl rastvora MTT u PBS puferu (5 mg/ml) po bunaru i test je nastavljen po opisanoj proceduri. Za određivanje broja adherentnih HUVEC ćelija Crystal violet test je obavljen po ranije opisanoj proceduri. Dobijenoj srednjoj vrednosti za kontrolnu grupu ćelija tretiranih samo lipofektaminom dodeljena je vrednost 100% i rezultati su predstavljeni kao procenat u odnosu na lipofektaminsku kontrolu. Eksperimenti su urađeni dva puta u tri ponovka.

3.5. Funkcionalni *in vitro* testovi

3.5.1. Test ćelijske invazije

Uticaj utišavanja ekspersije *MIF* gena na invazivna svojstva HTR-8/SVneo ćelija ispitivan je metodom koju su opisali Librach i saradnici (19) uz manje izmene. Umetci za ćelijsku kulturu sa dijametrom pora od 8 μm (Merck KGaA, Nemačka) postavljeni su u ploče od 24 mesta i obloženi Matrigelom (ECM obogaćen komponentama bazalne membrane) sa redukovanim sadržajem faktora rasta (Corning, SAD) (10 μl /bunar) koji je razblažen hladnim osnovnim RPMI 1640 medijumom do koncentracije 2.5 mg/ml. Matrigel je ostavljen 30 min na 37 °C da gelira nakon čega je zasejano 1×10^5 HTR-8/SVneo ćelija sakupljenih 48 h nakon transfekcije u 200 μl Opti-MEM medijuma. U bunar ispod inserta dodavano je 500 μl istog medijuma. Nakon 24 h inkubacije ćelije i Matrigel sa gornje strane umetka su nežno obrisani pamučnim tupferom, a ćelije na donjoj strani inserta fiksirane 10 min ledeno hladnim aceton-metanolom (1:1). Membrane umetka su odstranjene skalpelom i ćelije koje su zauzele pore i prošle na donju stranu umetka bojene su metodom bojenja po Gimzi. Na celoj površini membrane, pod svelosnim mikroskopom, brojane su zauzete pore i određivan je procenat zauzetih pora. Dobijenim vrednostima procenta zauzetih pora na celoj membrani za kontrolnu grupu ćelija tretiranih samo lipofektaminom (L) dodeljena je vrednost 100% i rezultati za ostale eksperimentalne grupe ćelija su predstavljeni kao procenat od L kontrole. Eksperimenti su urađeni tri puta u duplikatu.

3.5.2. Test formiranja tubula

Za ispitivanje uticaja MIF na diferencijaciju HTR-8/SVneo trofoblastnih ćelija ka endovaskularnom fenotipu korišćen je test formiranja tubula (eng. *tube formation assay*) - *in vitro* test angiogeneze, prema opisanoj proceduri uz unete određene izmene (172). Bunari ploče od 96 mesta obloženi su Matrigelom sa redukovanim sadržajem faktora rasta (Corning, SAD) (40 μl po bunaru) koji je razblažen hladnim Opti-MEM medijumom do finalne koncentracije od 7.5 mg/ml. Obložene ploče su ostavljene 30 min na 37 °C kako bi Matrigel gelirao nakon čega je zasejano 4×10^4 HTR-8/SVneo

ćelija po bunaru sakupljenih 72 h nakon transfekcije u 150 μ l Opti-MEM medijuma. Formirane tubularne strukture su slikane 6 h nakon inkubacije pomoću digitalnog fotoaparata (Canon, PowerShot S50, Canon Inc., Japan) na fazno-kontrastnom invertovanom svetlosnom mikroskopu (x10 uveličanje, Nikon TMS, Nikon Instruments, Inc., SAD). Slikana su 4 nepreklapajuća vidna polja po bunaru. Pomoću Image J softvera (National Institutes of Health, SAD) manuelno je urađena kvantitacija ukupne dužine tubula. Rezultati su predstavljeni u pikselima. Takođe, manuelno je određen i ukupan broj mesta grananja pri čemu mesto grananja predstavlja tačku od koje se granaju 2 ili više tubula. Eksperiment je urađen 4 puta u duplikatu.

3.5.3. Ko-kultura trofoblastnih HTR-8/SVneo i endotelnih HUVEC ćelija

Ko-kultura HTR-8/SVneo ćelija i HUVEC u monosloju korišćena je za ispitivanje uticaja MIF na interakciju EVT sa endotelnim ćelijama i na sposobnost integracije trofoblasta u endotelni monosloj. Eksperiment ko-kulture sproveden je prema opisanoj proceduri (173) uz manje izmene. HUVEC ćelije su zasejane na 0.2% želatinom presvučena pokrovna stakla \varnothing 13 mm koja su postavljena u bunare ploče od 24 mesta i gajene do postizanja monosloja u HUVEC medijumu. HTR-8/SVneo ćelije su sakupljene 72 h nakon transfekcije, obeležene 15 μ M Cell Tracker Blue CMAC plavom bojom (Molecular Probes, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., SAD) prema uputstvu proizvođača i 7.5×10^4 ćelija po bunaru je zasejano na HUVEC monosloj u 500 μ l mešavine kompletnog RPMI i HUVEC medijuma u odnosu 1:1. Nakon 24 h inkubacije ko-kultura je slikana pomoću fluorescentnog Carl Zeiss Axio Imager.A1 mikroskopa (x10 uveličanje) AxioCam MRm kamerom. Širom pokrovnih stakala sa ko-kulturom slikana su nepreklapajuća vidna polja. Obeležene HTR-8/SVneo ćelije predstavljene su na slikama svetlim segmentima na crnoj podlozi. Pomoću Image J softvera slike su konvertovane u binarne i za svaku sliku je izmeren procenat od ukupne površine vidnog polja koju zauzimaju beli pikseli što odgovara površini koju trofoblastne HTR-8/SVneo ćelije zauzimaju u endotelnom HUVEC monosloju. Vrednostima za prosečni procenat od površine koje HTR-8/SVneo ćelije zauzimaju u endotelnom HUVEC monosloju dobijenim za kontrolnu grupu ćelija tretiranih samo lipofektaminom (L) dodeljena je vrednost 100% i rezultati za ostale eksperimentalne

grupe ćelija su predstavljeni kao procenat od L kontrole. Eksperiment je urađen 4 puta u duplikatu.

3.6. Kvantitativna PCR analiza

Kvantitativna PCR analiza korišćena je za ispitivanje relativne ekspresije gena nakon utišavanja *MIF* u HTR-8/SVneo ćelijama, nakon LPS tretmana HTR-8/SVneo ćelija odnosno određivanja diferencijalne ekspresije gena kod HTR-8/SVneo i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelija. Ćelije su lizirane u TRIzol reagensu (Applied Biosystems, SAD) i ukupna RNK je izolovana prema uputstvu proizvođača. Komplementarna DNK (cDNK) dobijena je od 1 µg ukupne RNK korišćenjem 0.2 µg nasumičnih heksanukleotida (Invitrogen, SAD) (eksperimenti vezani za LPS tretman HTR-8/SVneo ćelija) odnosno 0.5 µg Oligo(dT) 12–18 prajmera (Invitrogen, SAD) (ostali eksperimenti), 250 µM od svakog dNTP (Applied Biosystems, SAD) i 200 U RevertAid reverzne transkriptaze (Fermentas, Litvanija) u 20 µl reakcione smeše. Kvantitativna PCR analiza (qPCR) urađena je na aparatu 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD). Reakciona smeša (10 µl) sastojala se od 1 µl cDNK matrice, 5 µl 2x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, SAD) i specifičnih prajmera (**Tabela 1**) u finalnoj koncentraciji od 0.5 µM. Reakcije su pripremane u duplikatu za svaki analizirani gen po svakom uzorku. Umnožavanje PCR produkata vršeno je prema sledećem temperaturnom programu: 95 °C 10 min, 40 ciklusa od 15 sekundi na 95 °C i 1 min na 60 °C. Ekspresija gena *TBP* u eksperimentima vezanim za LPS tretman HTR-8/SVneo ćelija odnosno *GAPDH* u ostalim eksperimentima, korišćena je za normalizaciju količine cDNK matrice korišćene u qPCR reakcijama. Relativni nivo ekspresije gena određen je komparativnom $\Delta\Delta C_t$ metodom (174) gde je $\Delta\Delta C_t$ vrednost inkorporisana u formulu $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Rezultati su prikazani kao stepen promene ekspresije ispitivanog gena u eksperimentalnim grupama ćelija u odnosu na ekspresiju u relevantnoj kontrolnoj grupi ćelija kojoj je dodeljena vrednost 1. Eksperimenti su urađeni najmanje tri puta.

Za poređenje ekspresije gena normalne trofoblastne HTR-8/SVneo ćelijske linije i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelijskih linija relativni nivo ekspresije ispitivanih gena

je određen pomoću ΔC_t vrednosti koja je inkorporisana u formulu $2^{-\Delta C_t}$. Dobijene vrednosti su prikazane na graficima. Eksperimenti su urađeni najmanje pet puta.

Tabela 1. Prajmeri korišćeni u radu

Naziv gena (eng.)	Simbol	Prajmeri	Dužina PCR produkta
Macrophage migration inhibitory factor	<i>MIF</i>	F: 5'-CCGGACAGGGTCTACATCA-3' R: 5'-ATTTCTCCCCACCAGAAGGT-3'	175 bp
Interleukin 6	<i>IL6</i>	F: 5'-GAGAAAGGAGACATGTAACAAGAGT-3' R: 5'-CGCAGAATGAGATGAGTTGT-3'	388 bp
C-X-C Motif Chemokine ligand 8 (raniji naziv - interleukin 8)	<i>CXCL8</i>	F: 5'-CTCTCTTGGCAGCCTTCCTGATT-3' R: 5'-AACTTCTCCACAACCCTCTGCAC-3'	253 bp
CD74 Molecule	<i>CD74</i>	F: 5'-GACCTTATCTCCAACAATGAGCAAC-3' R: 5'-AGCAGAGTCACCAGGATGGAA-3'	116 bp
C-X-C Motif Chemokine Receptor 2	<i>CXCR2</i>	F: 5'-ACATGGGCAACAATACAGCA-3' R: 5'-GAGGACGACAGCAAAGATG-3'	179 bp
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>	F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3' R: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTCC-3'	226 bp
TATA-Box Binding Protein	<i>TBP</i>	F: 5'-GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC-3' R: 5'-TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG-3'	118 bp

3.7. Izdvajanje subćelijskih frakcija

U flaskove za ćejsku kulturu površine 25 cm² zasejano je po 1 x 10⁶ HTR-8/SVneo, JAr i Jeg-3 ćelija u odgovarajućem kompletnom medijumu. Nakon dva dana u kulturi ćelije su odvojene od podloge 0.25% tripsinom koji sadrži 0.02% EDTA i izdvajanje subćelijskih frakcija je urađeno pomoću komercijalnog kita prema uputstvu proizvođača (Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells, Thermo Scientific, SAD). Nakon sprovedene procedure dobijeno je 5 subćelijskih frakcija: citoplazmatska (C), membranska (M), nuklearna solubilna (Ns), nuklearna hromatinska

(Nh) i citoskeletna (Cs). U ispitivanjima u ovom radu korišćene su prve četiri navedene subćelijske frakcije.

3.8. Elektroforetsko razdvajanje proteina i Western blot analiza

Za analizu ekspresije proteina u ovom radu korišćeno je elektroforetsko razdvajanje proteina na poliakrilamidnom gelu (eng. *polyacrylamide gel electrophoresis* - PAGE) nakon čega je vršena imunodetekcija proteina prenetih na nitroceluloznu membranu (Western blot analiza). Elektroforetsko razdvajanje proteina je vršeno u nativnim (nativna PAGE) ili denaturišućim i redukujućim uslovima (eng. *sodium dodecyl sulphate PAGE* – SDS-PAGE) (**Tabela 2**).

Za analizu diferencijalne ekspresije MIF HTR-8/SVneo, JAr i Jeg-3 ćelije su zasejane u Petrijeve šolje prečnika 65 mm (1 x 10⁶ ćelija/Petri šolja) u odgovarajućem kompletnom medijumu. Nakon 24 h u kulturi, ćelije su lizirane u odgovarajućim puferima.

Za analizu proteina u nativnoj formi, ćelije su lizirane u 20 mM Hepes (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina; J.T Baker, SAD) koji je sadržao 1% Triton X100 (Fisher Bioreagents, SAD) i koktel proteaznih inhibitora (Sigma, SAD). Koncentracija proteina u ukupnim lizatima, subćelijskim frakcijama i kondicioniranim medijumima određena je komercijalnim kitom BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, SAD) i ista količina proteina je nanošena na poliakrilamidni gel. Uzorci su pomešani sa 5x koncentrovanim puferom za uzorke (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 30% glicerol, 0.1% bromfenol plavo) u odnosu uzorak:pufer = 4:1. Uzorci su elektroforetski razdvajani na 6% ili 4-20% gradijentnom poliakrilamidnom gelu u nativnim uslovima.

Ukupni ćelijski lizati za analizu u redukujućim i denaturišućim uslovima pripremani su u 1x Lemli (eng. *Laemmli*) puferu (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.1% bromfenol plavo, 5% 2-merkaptotanol) sa dodatim koktelom proteaznih inhibitora. Kondicionirani medijumi i subćelijske frakcije su pripremani u 5x koncentrovanom Lemli puferu (medijum:pufer = 4:1). Uzorci su kuvani 5 min na 95 °C i elektroforetski razdvajani na 7.5, 10 ili 12.5% SDS-poliakrilamidnom gelu u zavisnosti od molekulske mase ispitivanog proteina u denaturišućim uslovima.

Tabela 2. Pregled uzoraka korišćenih u nativnoj i SDS-PAGE

Metoda	Uzorak	Eksperiment
Nativna PAGE	<u>HTR-8/SVneo, JAr i Jeg-3</u> <ul style="list-style-type: none"> • ukupni ćelijski lizati • subćelijske frakcije • kondicionirani medijumi 	Diferencijalna ekspresija MIF u normalnom i malignom trofoblastu
SDS - PAGE	<u>HTR-8/SVneo</u> <ul style="list-style-type: none"> • ukupni ćelijski lizati (48 h i 72 h nakon transfekcije) 	Utišavanje ekspresije <i>MIF</i>
	<u>HTR-8/SVneo</u> <ul style="list-style-type: none"> • ukupni ćelijski lizati • kondicionirani medijumi 	LPS tretman
	<u>HTR-8/SVneo, JAr i Jeg-3</u> <ul style="list-style-type: none"> • ukupni ćelijski lizati • subćelijske frakcije • kondicionirani medijumi 	Diferencijalna ekspresija MIF u normalnom i malignom trofoblastu

Nakon elektroforeze, proteini su prenošeni elektrotransferom na nitroceluloznu membranu. Nespecifično vezivanje je blokirano 1% kazeinom ili 1% albuminom iz goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumin* – BSA) 1 h na sobnoj temperaturi nakon čega su membrane inkubirane sa primarnim antitelima na 4 °C, preko noći uz stalno mućkanje. Primarna antitela koja su korišćena i njihova razblaženja prikazana su u **Tabeli 3**. Nakon ispiranja, membrane su inkubirane sa odgovarajućim biotinilovanim sekundarnim antitelima 30 min na sobnoj temperaturi. Sekundarna antitela koja su korišćena i njihova razblaženja prikazana su u **Tabeli 4**. Proteini su vizuelizovani korišćenjem avidin/biotin kompleksa sa peroksidazom (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, SAD) i ECL sistema za detekciju prema uputstvu proizvođača (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Pierce Biotechnology, SAD). Dobijeni signali su skenirani i denzitometrijski analizirani pomoću ImageMaster TotalLab v2.01 programa (Amersham Biosciences, Inc., SAD).

Ekspresija aktina (LPS tretman) odnosno GAPDH (ostali eksperimenti) korišćena je za normalizaciju količine nanetog uzorka kada je u denaturišućim i redukujućim uslovima analizirana relativna ekspresija proteina u ukupnim ćelijskim lizatima. Relativna ekspresija proteina prikazana je kao procenat ekspresije proteina u

eksperimentalnim grupama u odnosu na nivo ekspresije istog proteina u odgovarajućoj kontrolnoj grupi ćelija kojoj je dodeljena vrednost 100%. Eksperimenti su urađeni najmanje tri puta.

Tabela 3. Primarna antitela korišćena u radu

Antigen	Primarno antitelo	Proizvođač	Razblaženje	Primena
MIF	Mišje monoklonsko	MAB289 R&D Systems, UK	0.5 mg/ml	Imunocitohemija Western blot
Integrin α_1	Mišje monoklonsko	MAB5676 R&D Systems, UK	1 μ g/ml	Protočna citofluorimetrija
			0.33 μ g/ml	Western blot
Integrin α_5	Pacovsko monoklonsko	BIIG2 klon poklon laboratorije Susan Fisher (Univerzitet u Kaliforniji, San Francisko, SAD)	1:25	Protočna citofluorimetrija
Integrin β_1	Mišje monoklonsko	MAB1778 R&D Systems, UK	0.3 μ g/ml	Western blot
Integrin β_1	Pacovsko monoklonsko	AIB2 klon poklon laboratorije Susan Fisher (Univerzitet u Kaliforniji, San Francisko, SAD)	1:50	Protočna citofluorimetrija
N-kadherin	Mišje monoklonsko	33-3900 Invitrogen, SAD	10 μ g/ml	Protočna citofluorimetrija
fon Vilebrandov faktor	Kunićevo poliklonsko	A082 Dakopatts, Danska	1:7000	Imunocitohemija
GAPDH	Kunićevo monoklonsko	#2118 Cell Signaling, SAD	1:12000	Western blot
Aktin	Kunićevo monoklonsko	A5060 Sigma, SAD	1:6000	Western blot

Tabela 4. Sekundarna antitela korišćena u radu

Sekundarno antitelo	Proizvođač	Razblaženje	Primena
Biotinilovano anti-mišje IgG antitelo	Vector Laboratories, SAD	1:5000	Western blot
Biotinilovano anti-kunićevo IgG antitelo	Vector Laboratories, SAD	1:12000	Western blot
Anti-mišje IgG AlexaFluor 488 antitelo	Molecular Probes, SAD	1:3000	Imunocitohemija
		1:1000	Protočna citofluorimetrija
Anti-kunićevo IgG AlexaFluor 488 antitelo	Molecular Probes, SAD	1:6000	Imunocitohemija

3.9. Zimografsko određivanje aktivnosti enzima

Uticaj utišavanja ekspresije *MIF* u HTR-8/SVneo ćelijama na nivo MMP2 i MMP9 ispitivano je SDS-PAGE želatinskom zimografijom. Kondicionirani medijumi sakupljeni su 48 h nakon transfekcije, centrifugirani radi odstranjivanja ostataka ćelija i supernantanti su čuvani na -20°C do korišćenja u eksperimentima. Koncentracija proteina u kondicioniranim medijumima je određena komercijalnim kitom BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, SAD) i ista količina proteina je nanošena na poliakrilamidni gel. Kondicionirani medijumi pomešani su sa 5x koncentrovanim puferom za uzorke (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 0.1% bromfenol plavo) u odnosu uzorak:pufer = 4:1 i inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi pre elektroforeze. Uzorci su elektroforetski razdvajani na 10% SDS-poliakrilamidnom gelu debljine 1 mm koji sadrži 0.8 mg/ml želatina. Nakon elektroforeze, gelovi su isprani 3 puta po 10 min u 2.5% Triton X100 kako bi se uklonio SDS nakon čega je usledila renaturacija proteina u 50 mM Tris-HCl pH 7.5 puferu koji je sadržao 5 mM CaCl_2 i 200 mM NaCl na 37°C preko noći kada dolazi i do digestije želatina dejstvom MMP2 i MMP9. Nakon inkubacije, gelovi su bojeni Coomassie brilliant plavim G-250 (Merck KGaA, Nemačka) 30 min na sobnoj temperaturi i odbojavani rastvorom 30% metanola i

10% glacijalne sirćetne kiseline. Proteazna aktivnost predstavljena je providnim trakama razloženog želatina na mestu lokalizacije želatinaza u gelu. Nivo proteazne aktivnosti MMP2 i MMP9 određen je semikvantitativno denzitometrijskom analizom zimograma pomoću ImageMaster TotalLab v2.01 programa. Dobijenim vrednostima za ćelije tretirane samo lipofektaminom (L) dodeljena je vrednost 100% i rezultati su prikazani kao procenat od L kontrole. Eksperiment je urađen najmanje 3 puta u duplikatu.

3.10. Protočna citofluorimetrija

Protočna citofluorimetrija je korišćena za ispitivanje uticaja utišavanja ekspresije *MIF* u HTR-8/SVneo ćelijama na ekspresiju posrednika invazije trofoblasta: integrinskih subjedinica α_1 , α_5 i β_1 i N-kadherina. HTR-8/SVneo ćelije sakupljene su 48 h i 72 h nakon transfekcije i isprane u PBS puferu. Ćelije su fiksirane u 2% paraformaldehidu 15 min u mraku na sobnoj temperaturi nakon čega su permeabilizovane u puferu za permeabilizaciju (2% FCS, 0.1% BSA, 0.1% TritonX100 u PBS puferu). Inkubacija sa primarnim antitelima vršena je 45 min na 4 °C nakon čega su ćelije isprane i inkubirane sa sekundarnim antitelima 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije i ispiranja, ćelije su resuspendovane u 4% formaldehidu, 0.01% Na-azidu rastvorenim u PBS puferu. Primarna i sekundarna antitela koja su korišćena i njihova razblaženja prikazana su u **Tabeli 3 i 4**. Merenja su vršena na BD LSR citometru (BD Biosciences, SAD) a dobijeni rezultati su obrađeni pomoću FlowJo softvera (Flow Jo LLC, SAD). Dobijenim vrednostima za prosečan intenzitet fluorescence (eng. *mean fluorescence intensity* - MFI) koji je izmeren kod kontrolne grupe ćelija koje su tretirane samo lipofektaminom (L) dodeljena je vrednost 100% i rezultati su prikazani kao procenat od L kontrole. Eksperimenti su urađeni najmanje tri puta.

3.11. Statistička obrada podataka

Podaci su analizirani pomoću GraphPad Prism Demo Software (GraphPad Software, Inc., SAD). Nakon utvrđene normalne raspodele Šapiro-Vilkovim testom (eng. *Shapiro-Wilk test*) podaci su analizirani metodom jednofaktorske analize varijanse (eng. *One-way analysis of variance* - ANOVA) a post-hoc analiza je vršena Takijevim

testom (eng. *Tukey post-hoc test*) ($\alpha = 0.05$). Za analizu podataka dobijenih u eksperimentima nakon tretmana LPS HTR-8/SVneo ćelija korišćen je Studentov t-test nakon utvrđene normalne raspodele podataka Šapiro-Vilkovim testom. Vrednosti su smatrane statistički značajno različitim kada je $p < 0.05$.

REZULTATI

4.1. Značaj endogenog MIF za funkciju ekstravilusnih trofoblastnih HTR-8/SVneo ćelija

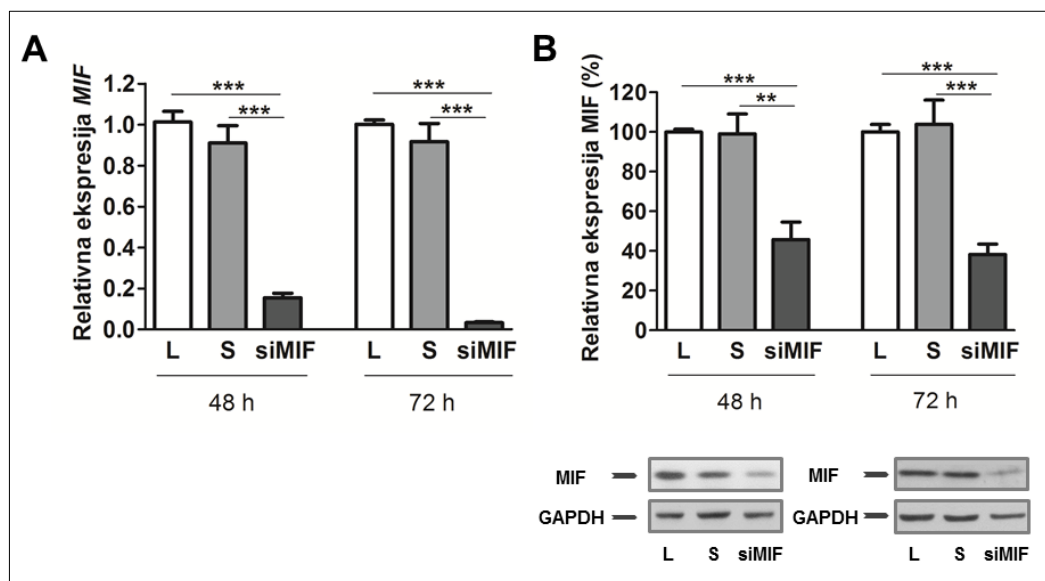
U ovom radu ispitivali smo značaj endogenog MIF za funkciju EVT sa naročitim osvrtom na značaj ovog citokina za endovaskularni trofoblast. Ispitivanja su vršena pomoću utišavanja ekspresije MIF putem siRNA u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji i daljim praćenjem efekata utišavanja ovog citokina na promenu funkcije ćelija i ekspresiju molekula značajnih za funkcionalna svojstva trofoblasta.

4.1.1. Utišavanje ekspresije *MIF* gena u transfekovanim HTR-8/SVneo ćelijama

Pre daljih ispitivanja značaja endogenog MIF za funkciju trofoblasta bilo je neophodno utvrditi da li je utišavanje ekspresije *MIF* pomoću specifične siRNA u HTR-8/SVneo ćelijama bilo uspešno. qPCR metodom utvrđeno je da je transfekcija HTR-8/SVneo ćelija specifičnom siRNA značajno smanjila relativnu ekspresiju *MIF* iRNK 48 h nakon transfekcije (siMIF eksperimentalna grupa ćelija) u odnosu na ekspresiju u kontrolnim grupama ćelija tretiranim samo lipofektaminom (L eksperimentalna grupa ćelija) odnosno negativnom kontrolnom siRNA (S eksperimentalna grupa ćelija) (stepen promene 1 ± 0.05 za L, 0.9 ± 0.08 za S, 0.2 ± 0.02 za siMIF grupu ćelija; L vs siMIF $p < 0.001$, S vs siMIF $p < 0.001$) (**Slika 13A**). Nakon 72 h od transfekcije efekat utišavanja ekspresije *MIF* iRNK bio je još izraženiji (stepen promene 1 ± 0.02 za L, 0.9 ± 0.09 za S, 0.03 ± 0.004 za siMIF grupu ćelija; L vs siMIF $p < 0.001$, S vs siMIF $p < 0.001$) (**Slika 13A**).

Western blot metodom utvrđeno je da je relativna ekspresija MIF proteina takođe značajno smanjena u ćelijama transfekovanim specifičnom siRNA 48 h i 72 h nakon transfekcije u odnosu na L i S kontrolne grupe ćelija (48 h: $100\% \pm 1.3$ za L, $99\% \pm 10$ za S, $45.8\% \pm 8.8$ za siMIF; L vs siMIF $p < 0.001$, S vs siMIF $p < 0.01$; 72 h: $100\% \pm 3.7$ za L, $103.8\% \pm 12.2$ za S, $38.2\% \pm 5.2$ za siMIF; L vs siMIF $p < 0.001$, S vs siMIF $p < 0.001$) (**Slika 13B**).

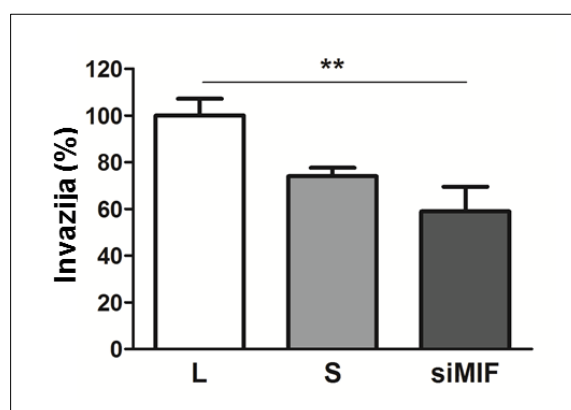
Nakon što je potvrđeno uspešno utišavanje ekspresije MIF transfekovane HTR-8/SVneo ćelije korišćene su u daljim ispitivanjima 48 h ili 72 h nakon transfekcije.



Slika 13. Relativna ekspresija *MIF* gena u transfekovanim HTR-8/SVneo ćelijama. (A) Ekspresija *MIF* iRNK određena je 48 h i 72 h nakon transfekcije qPCR metodom. Rezultati su prikazani kao stepen promene ekspresije *MIF* iRNK u odnosu na ekspresiju u kontrolnim ćelijama tretiranim lipofektaminom + SEM; *** $p < 0.001$; $n = 6$ (48 h), $n = 4$ (72 h) (B) Ekspresija MIF proteina određena je 48 h i 72 h nakon transfekcije denzitometrijskom analizom nakon Western blot-a. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i grafički prikaz relativne ekspresije MIF koja je predstavljena kao procenat u odnosu na ekspresiju u kontrolnim ćelijama tretiranim lipofektaminom + SEM; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 3$ (48 h), $n = 4$ (72 h); L - ćelije tretirane samo lipofektaminom, S - ćelije transfekovane negativnom kontrolnom siRNA, siMIF - ćelije transfekovane specifičnom siRNA za *MIF* iRNK.

4.1.2. Uticaj utišavanja ekspresije *MIF* gena na invazivnost HTR-8/SVneo ćelija

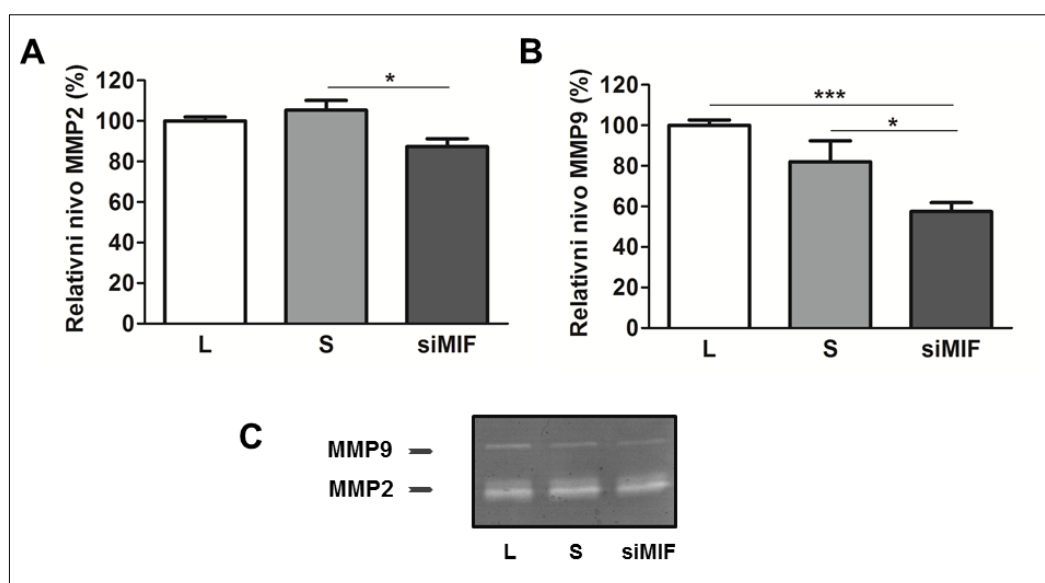
Pomoću funkcionalnog *in vitro* testa ćelijske invazije kroz Matrigel utvrdili smo da 48 h nakon transfekcije dolazi do smanjenja invazivnosti HTR-8/SVneo ćelija kod kojih je utišana ekspresija *MIF* ($100\% \pm 7.2$ za L, $74\% \pm 3.6$ za S, $59\% \pm 10.6$ za siMIF, L vs siMIF $p < 0.01$) (Slika 14).



Slika 14. Uticaj utišavanja ekspresije *MIF* gena na invazivnost HTR-8/SVneo ćelija 48 h nakon transfekcije. Rezultati su dobijeni merenjem prosečnog procenta zauzetih pora na membrani inserta i prikazani su kao procenat u odnosu na vrednost dobijenu za kontrolne ćelije tretirane samo lipofektaminom + SEM; ** $p < 0.01$; $n = 3$; L - ćelije tretirane samo lipofektaminom, S - ćelije transfekovane negativnom kontrolnom siRNA, siMIF - ćelije transfekovane specifičnom siRNA za *MIF* iRNK.

4.1.3. Uticaj utišavanja ekspresije *MIF* gena na nivo MMP2 i MMP9 u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija

Nivo MMP2 i MMP9, značajnih posrednika u procesu invazije ćelija trofoblasta, ispitivan je putem želatinske SDS-PAGE zimografije u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija sakupljenim 48 h nakon transfekcije. Nivo MMP2 u kondicioniranim medijumima siMIF grupe ćelija bio je značajno smanjen u odnosu na nivo u kondicioniranim medijumima kontrolnih S ćelija ($100\% \pm 2$ za L, $105.3\% \pm 4.8$ za S, $87.4\% \pm 3.8$ za siMIF; S vs siMIF $p < 0.05$) (**Slika 15A**) dok je nivo sekretovane MMP9 u istim uzorcima siMIF grupe ćelija bio značajno smanjen odnosu na obe kontrolne grupe ćelija ($100\% \pm 2.7$ za L, $82\% \pm 10.4$ za S, $57.5\% \pm 4.3$ za siMIF; L vs siMIF $p < 0.001$, S vs siMIF $p < 0.05$) (**Slika 15B**).

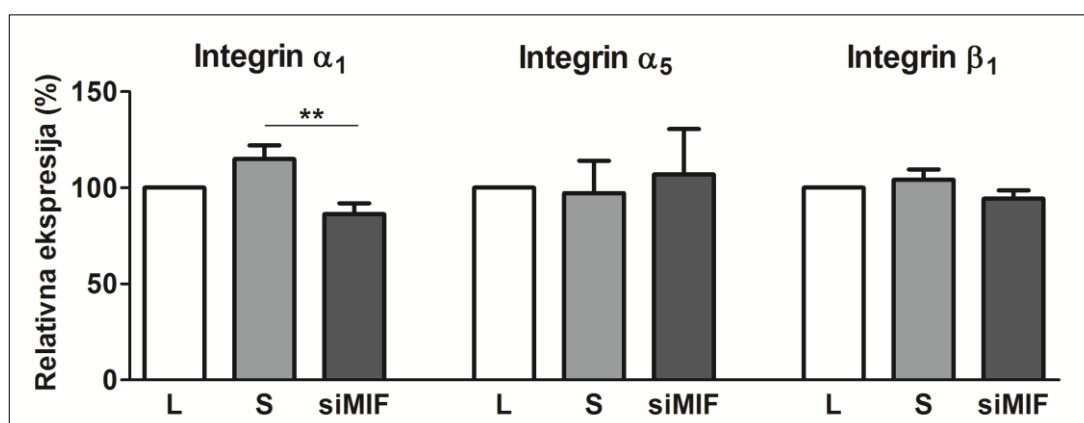


Slika 15. Uticaj utišavanja ekspresije *MIF* gena na nivo MMP2 (A) i MMP9 (B) u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija. Relativni nivo MMP2 i MMP9 u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija 48 h nakon transfekcije je određen SDS-PAGE želatinskom zimografijom. Rezultati su prikazani kao procenat u odnosu na vrednost dobijenu za kontrolne ćelije tretirane samo lipofektaminom + SEM; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; $n = 5$;

(C) Reprezentativni zimogram; L - ćelije tretirane samo lipofektaminom, S - ćelije transfekovane negativnom kontrolnom siRNA, siMIF - ćelije transfekovane specifičnom siRNA za *MIF* iRNK.

4.1.4. Uticaj utišavanja ekspresije *MIF* gena u HTR-8/SVneo ćelijama na ekspresiju integrinskih subjedinica α_1 , α_5 i β_1

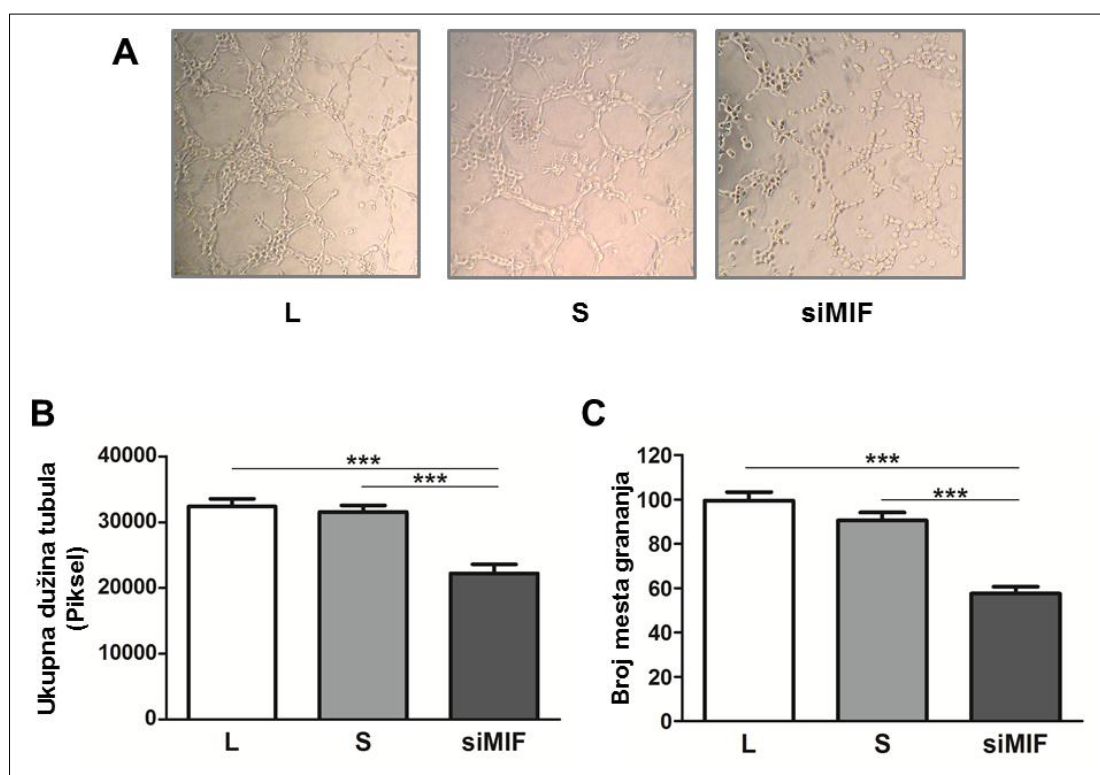
Integrini predstavljaju značajne posrednike u procesu invazije trofoblasta. Protočnom citofluorimetrijom ispitan je uticaj utišavanja ekspresije *MIF* u HTR-8/SVneo ćelijama na ekspresiju integrinskih subjedinica α_1 , α_5 i β_1 48 h nakon transfekcije. Utvrđeno je da je ekspresija α_1 integrinske subjedinice u siMIF ćelijama bila značajno smanjena u odnosu na ekspresiju u S kontrolnim ćelijama (100% za L, 115% \pm 7 za S, 86.4% \pm 5.6 za siMIF; S vs siMIF $p < 0.01$) (Slika 16). Utišavanje ekspresije *MIF* gena u HTR-8/SVneo ćelijama nije imalo uticaja na ekspresija druge dve ispitivane integrinske subjedinice (Slika 16).



Slika 16. Uticaj utišavanja ekspresije *MIF* gena u HTR-8/SVneo ćelijama na ekspresiju integrinskih subjedinica α_1 , α_5 i β_1 48 h nakon transfekcije. Rezultati su dobijeni merenjem prosečnog intenziteta fluorescence na protočnom citofluorimetru i prikazani su kao procenat u odnosu na vrednost dobijenu za kontrolne ćelije tretirane samo lipofektaminom + SEM; ** $p < 0.01$; $n = 6$ (Integrin α_1), $n = 4$ (Integrin α_5), $n = 3$ (Integrin β_1); L - ćelije tretirane samo lipofektaminom, S - ćelije transfekovane negativnom kontrolnom siRNA, siMIF - ćelije transfekovane specifičnom siRNA za *MIF* iRNK.

4.1.5. Uticaj utišavanja ekspresije *MIF* gena na sposobnost HTR-8/SVneo ćelija da formiraju tubularne strukture

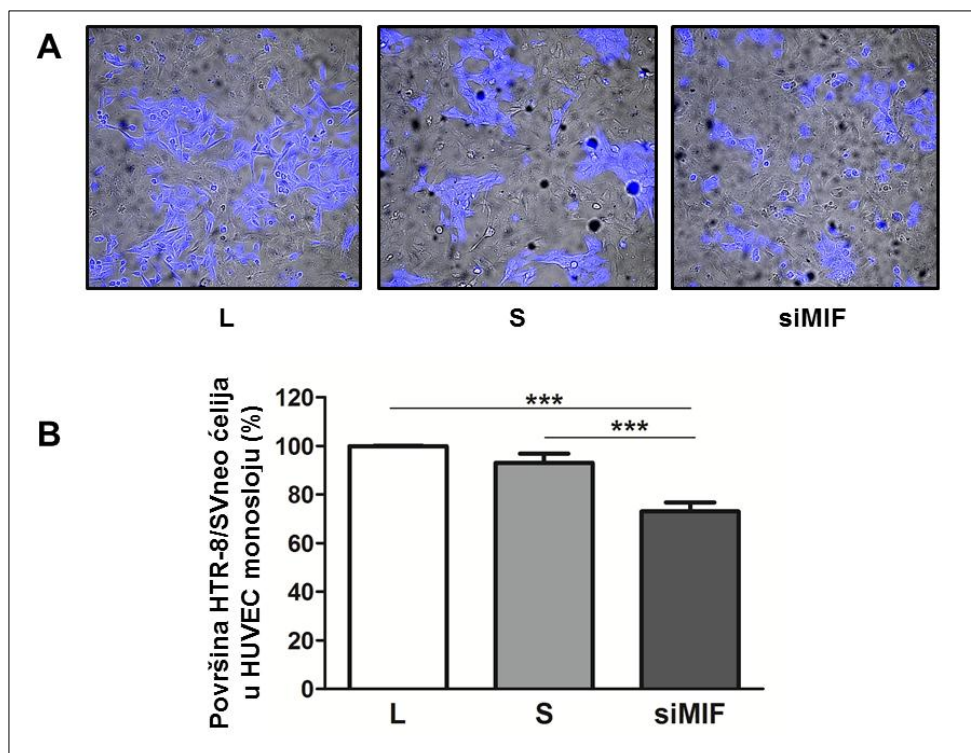
U funkcionalnom testu formiranja tubula, široko prihvaćenom *in vitro* testu za angiogenezu, korišćene su HTR-8/SVneo ćelije 72 h nakon transfekcije. Ukupna dužina tubula koje su formirale HTR-8/SVneo ćelije nakon utišavanja ekspresije *MIF* bila je značajno manja u odnosu na obe kontrolne grupe ćelija (32398 ± 1137 za L, 31536 ± 1007 za S, 2218 ± 1352 piksela za siMIF grupu ćelija, L vs siMIF $p < 0.001$, S vs siMIF $p < 0.001$) (Slika 17B). Takođe, ukupan broj mesta grananja tubularnih struktura koje su formirale ćelije nakon utišavanja ekspresije *MIF* bio je značajno manji u poređenju sa obe kontrolne grupe ćelija (99.6 ± 3.8 za L, 90.6 ± 3.6 za S, 57.6 ± 3 za siMIF grupu ćelija, L vs siMIF $p < 0.001$, S vs siMIF $p < 0.001$) (Slika 17C)



Slika 17. Uticaj utišavanja ekspresije *MIF* gena na sposobnost HTR-8/SVneo ćelija da formiraju tubularne strukture. (A) Prikaz reprezentativnog eksperimenta testa formiranja tubula HTR-8/SVneo ćelija 72 h nakon transfekcije. (B) Ukupna dužina tubula predstavljena u pikselima + SEM. (C) Ukupan broj mesta grananja predstavljen u apsolutnim brojevima + SEM; *** $p < 0.001$; $n = 4$; L - ćelije tretirane samo lipofektaminom, S - ćelije transfekovane negativnom kontrolnom siRNA, siMIF - ćelije transfekovane specifičnom siRNA za *MIF* iRNK.

4.1.6. Uticaj utišavanja ekspresije *MIF* gena na integraciju HTR-8/SVneo ćelija u monosloj endotelних HUVEC ćelija

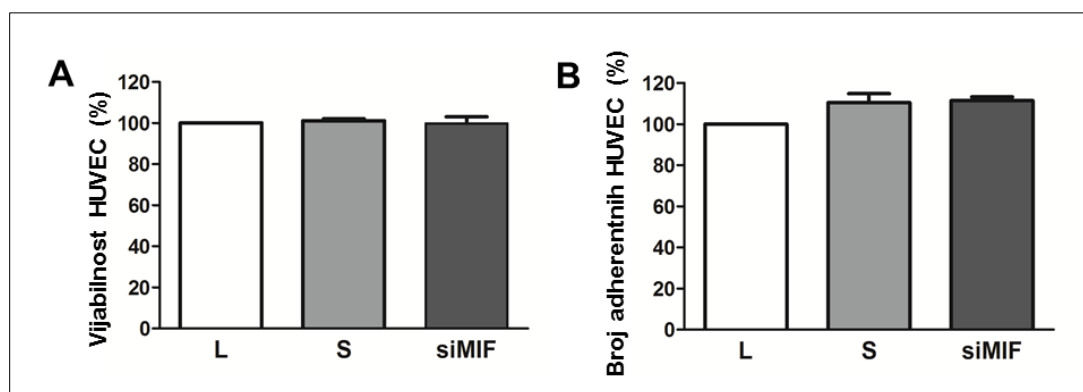
U toku prvog trimestra trudnoće dolazi do interakcije endotela decidualnih spiralnih arterija i endovaskularnog EVT koji vrši invaziju u zidove ovih krvnih sudova dovodeći do njihove degradacije i remodelovanja. U ovom radu korišćen je metod ko-kulture trofoblastnih HTR-8/SVneo ćelija i monosloja endotelних HUVEC ćelija radi ispitivanja interakcije ova dva tipa ćelija *in vitro*. Nakon utišavanja ekspresije *MIF*, HTR-8/SVneo ćelije su imale značajno manju sposobnost integracije u monosloj endotelних HUVEC ćelija u odnosu na obe kontrolne grupe ćelija ($100\% \pm 0.02$ za L, $93\% \pm 3.8$ za S, $73\% \pm 3.8$ za siMIF, L vs siMIF $p < 0.001$, S vs siMIF $p < 0.001$) (Slika 18B).



Slika 18. Uticaj utišavanja ekspresije *MIF* gena na integraciju transfekovanih HTR-8/SVneo ćelija u monosloj endotelnih HUVEC ćelija. (A) Prikaz reprezentativnog eksperimenta nakon 24 h ko-kulture HUVEC u monosloju (fazno-kontrastno) i HTR-8/SVneo ćelija (plavo) 72 h nakon transfekcije. (B) Površina koju transfekovane HTR-8/SVneo ćelije zauzimaju u HUVEC monosloju nakon 24 h ko-kulture. Rezultati su prikazani kao procenat u odnosu na vrednost dobijenu za kontrolne ćelije tretirane samo lipofektaminom + SEM; *** $p < 0.001$; $n = 4$; L - ćelije tretirane samo lipofektaminom, S - ćelije transfekovane negativnom kontrolnom siRNA, siMIF - ćelije transfekovane specifičnom siRNA za *MIF* iRNK.

4.1.7. Uticaj kondicioniranih medijuma HTR-8/SVneo ćelija nakon utišavanja ekspresije *MIF* gena na vijabilnost i broj adherentnih endotelnih HUVEC ćelija

Nakon što je utvrđeno da *MIF* utiče na interakciju HTR-8/SVneo i endotelnih HUVEC ćelija, želeli smo da ispitamo mogućnost da faktori koje sekretuju HTR-8/SVneo ćelije posreduju u ovom procesu. Pomoću MTT i Crystal violet testova ispitivali smo uticaj kondicioniranih medijuma sakupljenih 72 h nakon transfekcije na vijabilnost i broj adherentnih HUVEC ćelija. Rezultati prikazani na **slici 19** pokazuju da kondicionirani medijumi HTR-8/SVneo ćelija nakon utišavanja *MIF* nisu uticali na vijabilnost i broj adherentnih HUVEC ćelija.

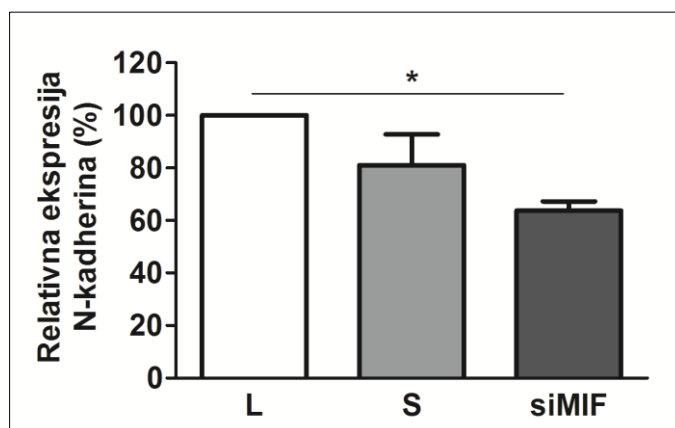


Slika 19. Uticaj kondicioniranih medijuma HTR-8/SVneo ćelija 72 h nakon utišavanja ekspresije *MIF* gena na vijabilnost (A) i broj adherentnih endotelnih HUVEC ćelija (B). Vijabilnost ćelija određena je MTT testom, broj adherentnih ćelija je određen Crystal violet testom. Rezultati su prikazani kao procenat u odnosu na vrednost dobijenu za kontrolnu grupu ćelija tretiranih lipofektaminom + SEM; n = 2; L - ćelije tretirane samo lipofektaminom, S - ćelije transfekovane negativnom kontrolnom siRNA, siMIF - ćelije transfekovane specifičnom siRNA za *MIF* iRNK.

4.1.8. Uticaj utišavanja ekspresije *MIF* gena u HTR-8/SVneo ćelijama na ekspresiju N-kadherina

S obzirom na to da literaturni podaci ukazuju na važnost N-kadherina za invaziju trofoblasta i njihovu interakciju sa endotelnim ćelijama (42,175) protočnom citofluorimetrijom ispitivali smo uticaj utišavanja ekspresije *MIF* u HTR-8/SVneo ćelijama na ekspresiju ovog kadherina 72 h nakon transfekcije. Utvrđeno je da je ekspresija N-kadherina značajno smanjena nakon utišavanja ekspresije *MIF* u odnosu na

ekspresiju ovog kadherina u kontrolnoj L grupi ćelija (100% za L, $81\% \pm 11.7$ za S, $63.7\% \pm 3.5$ za siMIF, L vs siMIF $p < 0.05$) (Slika 20).

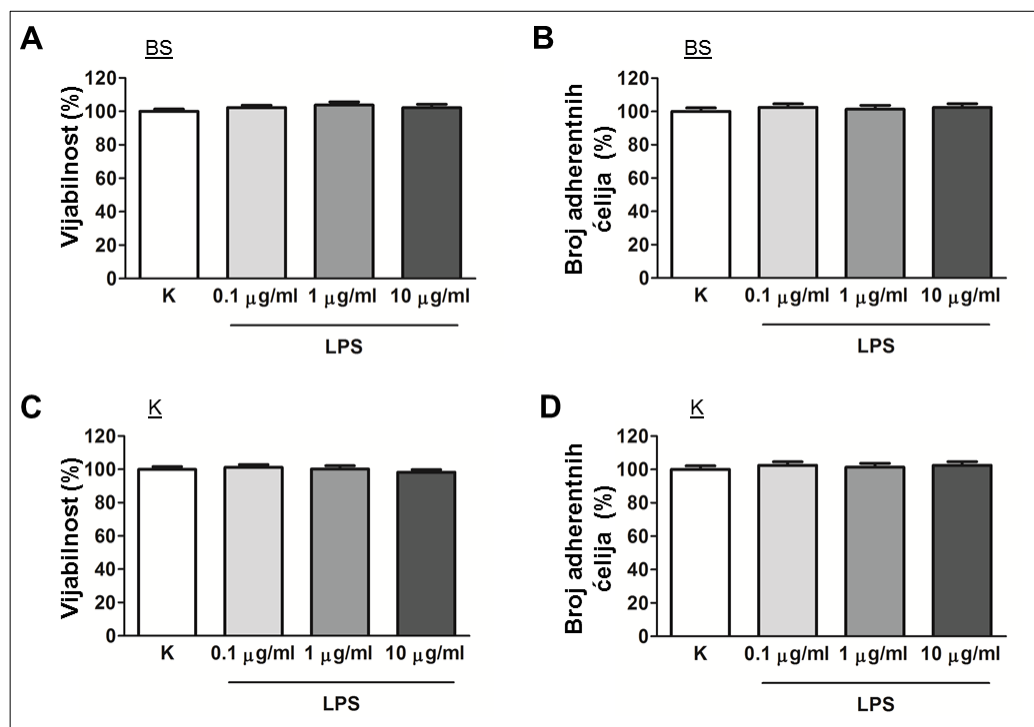


Slika 20. Uticaj utišavanja ekspresije *MIF* gena u HTR-8/SVneo ćelijama na ekspresiju N-kadherina 72 h nakon transfekcije. Rezultati su dobijeni merenjem prosečnog intenziteta fluorescencije na protočnom citofluorimetru i prikazani su kao procenat u odnosu na vrednost dobijenu za kontrolnu grupu ćelija tretiranih + SEM; * $p < 0.05$; $n = 3$; L - ćelije tretirane samo lipofektaminom, S - ćelije transfekovane negativnom kontrolnom siRNA, siMIF - ćelije transfekovane specifičnom siRNA za *MIF* iRNK.

4.2. Ispitivanje ekspresije MIF i drugih proinflamatornih citokina u odgovoru HTR-8/SVneo ćelija na tretman LPS

4.2.1. Uticaj LPS na vijabilnost i broj adherentnih HTR-8/SVneo ćelija

HTR-8/SVneo ćelije su tretirane LPS u koncentraciji 0.1, 1 i 10 $\mu\text{g/ml}$, 24 h u medijumu bez seruma i u kompletnom medijumu. Utvrdili smo da LPS ne utiče na vijabilnost i broj adherentnih HTR-8/SVneo ćelija ni u jednoj ispitivanoj koncentraciji u ili bez prisustva seruma (Slika 21). Imajući u vidu ove rezultate za dalja ispitivanja korišćen je tretman LPS u finalnoj koncentraciji 0.1, 1 i 10 $\mu\text{g/ml}$ prilikom kultivacije u kompletnom medijumu 24 h ukoliko drugačije nije navedeno



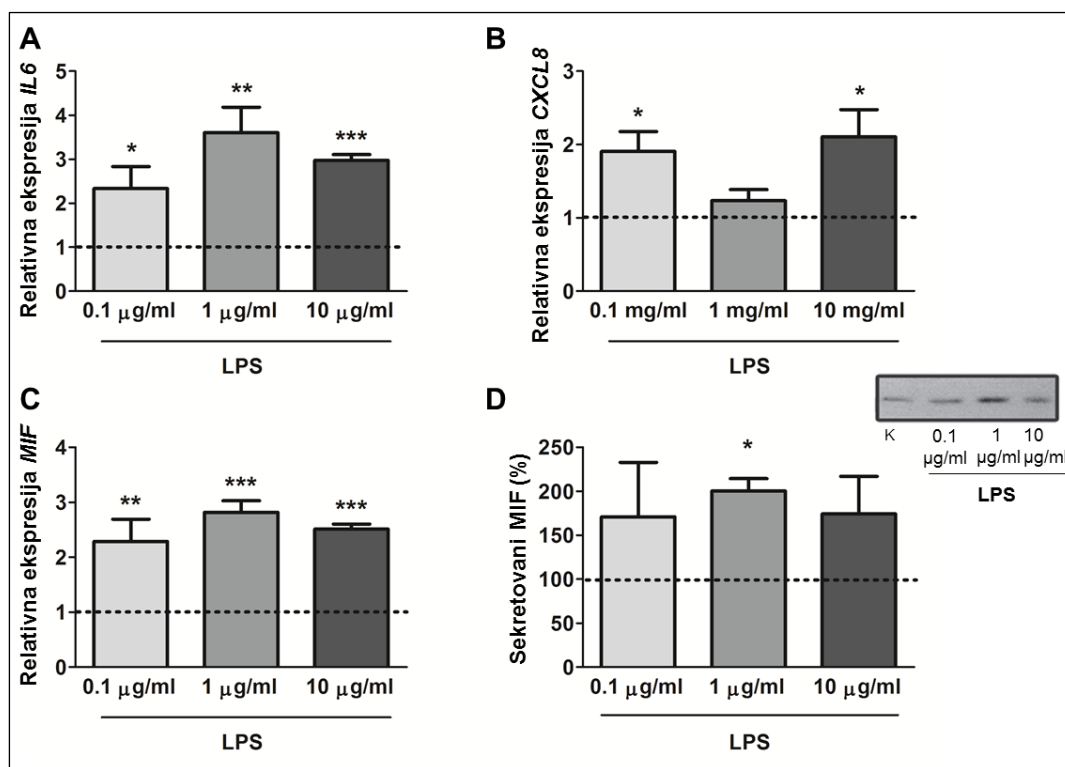
Slika 21. Uticaj LPS na vijabilnost (A,C) i broj adherentnih HTR-8/SVneo ćelija (B,D). Tretman 0.1, 1 i 10 µg/ml LPS 24 h u medijumu bez seruma (BS)(A,B), u kompletnom medijumu (K). Vijabilnost ćelija određena je MTT testom, broj adherentnih ćelija je određen Crystal violet testom. Dobijene vrednosti su predstavljene kao procenat u odnosu na kontrolu (K) + SEM; n = 2.

4.2.2. Uticaj LPS na ekspresiju proinflamatornih citokina MIF, IL6 i IL8 u HTR-8/SVneo ćelijama

Nakon što je utvrđeno da LPS nema uticaja na vijabilnost i broj adherentnih ćelija, qPCR metodom ispitivan je njegov uticaj na ekspresiju gena za proinflamatorne citokine: *MIF*, *IL-6 (IL6)* i *IL-8 (CXCL8)* na nivou iRNK u HTR-8/SVneo ćelijama. Dobijeni rezultati potvrđuju ranije pokazano povećanje ekspresije *IL6* i *CXCL8* gena nakon LPS tretmana (176). Nivo ekspresije *IL6* bio je povećan nakon primene svih ispitivanih koncentracija LPS u odnosu na ekspresiju u kontrolnim ćelijama koje nisu bile tretirane LPS (K) (stepen promene 2.3 ± 0.5 za 0.1 µg/ml LPS, vs K $p < 0.05$; 3.6 ± 0.6 za 1 µg/ml LPS, vs K $p < 0.01$; 3 ± 0.1 za 10 µg/ml LPS, vs K $p < 0.001$) (**Slika 22A**). Nivo ekspresije *CXCL8* bio je statistički značajno povećan nakon tretmana LPS u koncentraciji 0.1 i 10 µg/ml u odnosu na ekspresiju u u kontrolnim ćelijama (stepen

promene 1.9 ± 0.3 za $0.1 \mu\text{g/ml}$ LPS, vs K $p < 0.05$; 2.1 ± 0.4 za $10 \mu\text{g/ml}$ LPS, vs K $p < 0.05$) (Slika 22B).

Rezultati ispitivanja su pokazali da je pod uticajem LPS došlo i do povećanja ekspresije *MIF* gena u HTR-8/SVneo ćelijama kao i do povećanja sekrecije MIF proteina što je po prvi put pokazano za ćelije trofoblasta. LPS tretman u svim ispitivanim koncentracijama je dovodio do značajnog povećanja *MIF* iRNK u odnosu na kontrolne ćelije (stepen promene 2.3 ± 0.4 za $0.1 \mu\text{g/ml}$ LPS, vs K $p < 0.01$; 2.8 ± 0.2 za $1 \mu\text{g/ml}$ LPS, vs K $p < 0.001$; 2.5 ± 0.1 za $10 \mu\text{g/ml}$ LPS, vs K $p < 0.001$) (Slika 22C). Pored toga, nivo MIF u kondicioniranom medijumu HTR-8/SVneo ćelija tretiranih $1 \mu\text{g/ml}$ LPS bio je značajno povećan u odnosu na nivo MIF u kondicioniranom medijumu kontrolnih ćelija ($200\% \pm 14$, vs K $p < 0.05$) (Slika 22D).



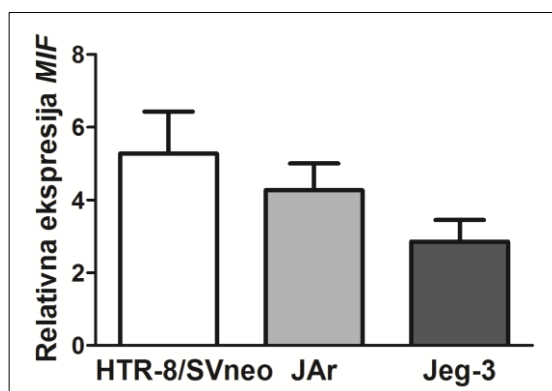
Slika 22. Uticaj LPS na ekspresiju *MIF*, *IL6* i *CXCL8* u HTR-8/SVneo ćelijama. Relativna ekspresija *IL6* (A), *CXCL8* (B) i *MIF* (C) iRNK pod uticajem 0.1, 1 i $10 \mu\text{g/ml}$ LPS tretmana 24 h određena qPCR metodom. Rezultati su prikazani kao stepen promene ekspresije iRNK u tretiranim ćelijama u odnosu na ekspresiju u kontrolnim ćelijama + SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 3$ (A,B,C). (D) Prikazan je reprezentativni imunoblot i grafički prikaz relativnog nivoa MIF u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija 24 h tretiranih 0.1, 1 i $10 \mu\text{g/ml}$ LPS određen Western blot metodom. Rezultati su predstavljani kao procenat u odnosu na nivo MIF u kondicioniranim medijumima kontrolnih ćelija + SEM; * $p < 0.05$; $n = 2$; Isprekidanom linijom označena je relativna ekspresija u kontrolnim ćelijama

4.3. Diferencijalna ekspresija MIF u ćelijskim linijama normalnog i maligno transformisanog trofoblasta

Promenjena ekspresija MIF i njegovih receptora u odnosu na zdrava tkiva karakteristična je za niz do sada ispitivanih malignih tumora. U ovom radu ispitana je po prvi put razlika u ekspresiji, sekreciji i u molekulskim formama MIF u ćelijskim linijama normalnog ekstravilusnog trofoblasta HTR-8/SVneo i u JAr i Jeg-3 horiokarcinomskim ćelijskim linijama.

4.3.1. Ekspresija *MIF* gena u HTR-8/SVneo ćelijama normalnog trofoblasta i horiokarcinomskim JAr i Jeg-3 ćelijama

qPCR metodom utvrđeno je da se ekspresija *MIF* iRNK ne razlikuje između HTR-8/SVneo i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelija (**Slika 23**).

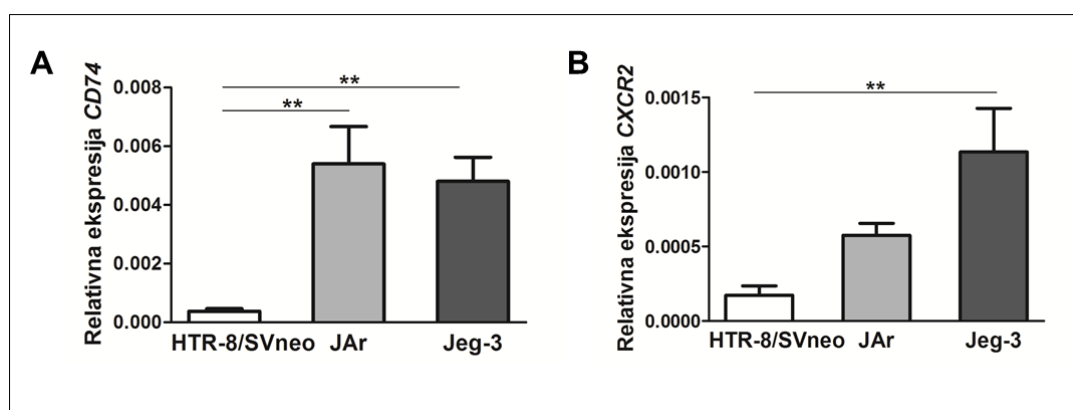


Slika 23. Relativna ekspresija *MIF* iRNK u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji normalnog trofoblasta i horiokarcinomskim JAr i Jeg-3 ćelijskim linijama. Rezultati su dobijeni qPCR metodom i prikazani su kao $2^{-\Delta C_t}$ vrednosti + SEM; n = 6.

4.3.2. Ekspresija *CD74* i *CXCR2* gena u HTR-8/SVneo ćelijama normalnog trofoblasta i horiokarcinomskim JAr i Jeg-3 ćelijama

Ekspresija *CD74* i *CXCR2* gena za receptore za MIF na nivou iRNK ispitana je takođe qPCR metodom. Utvrđeno je da je relativna ekspresija *CD74* iRNK značajno viša u horiokarcinomskim JAr i Jeg-3 ćelijama u odnosu na HTR-8/SVneo ćelije (vrednost $2^{-\Delta C_t}$ za HTR-8/SVneo $0.0004 \pm 8.8 \times 10^{-5}$, JAr 0.005 ± 0.001 , Jeg-3

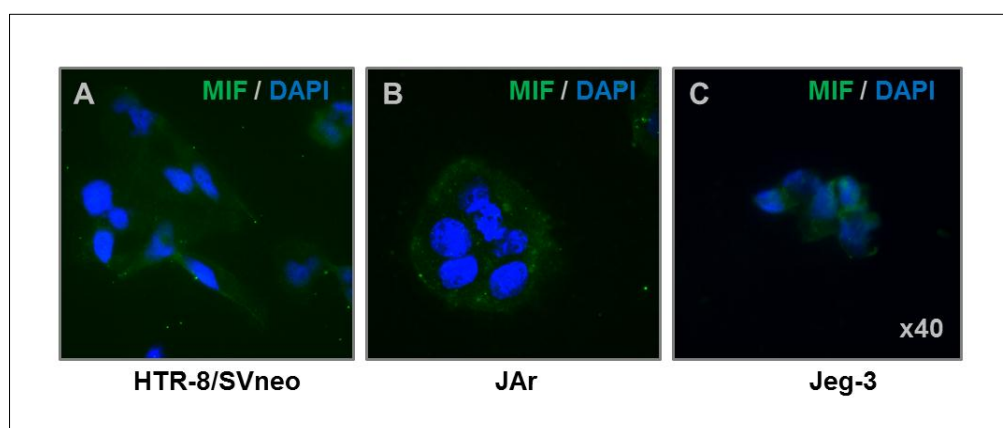
0.05 ± 0.0008 ; HTR-8/SVneo vs JAr $p < 0.01$, HTR-8/SVneo vs Jeg-3 $p < 0.01$) (Slika 24A). U Jeg-3 ćelijama *CXCR2* iRNK je značajno više eksprimirana u odnosu na HTR-8/SVneo ćelije ($p < 0.01$) dok se ne razlikuje u odnosu na ekspresiju ovog gena u JAr ćelijama (vrednost $2^{-\Delta Ct}$ HTR-8/SVneo $0.0002 \pm 6.3 \times 10^{-5}$, JAr $0.0006 \pm 8 \times 10^{-5}$, Jeg-3 0.001 ± 0.0003) (Slika 24B).



Slika 24. Relativna ekspresija *CD74* (A) i *CXCR2* (B) gena u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji normalnog trofoblasta i horiokarcinomskim JAr i Jeg-3 ćelijskim linijama. Rezultati su dobijeni qPCR metodom i prikazani su kao $2^{-\Delta Ct}$ vrednosti + SEM; ** $p < 0.01$; n = 5.

4.3.3. Imunolokalizacija MIF u HTR-8/SVneo ćelijama normalnog trofoblasta i horiokarcinomskim JAr i Jeg-3 ćelijama

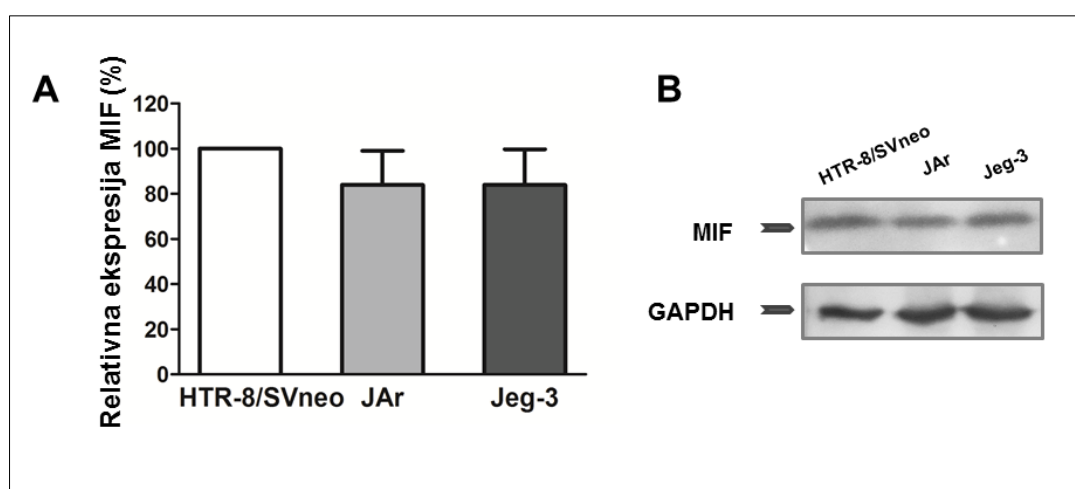
Ekspresija i lokalizacija MIF u ćelijskim linijama normalnog i maligno transformisanog trofoblasta ispitivane su imunofluorescentnim bojenjem. Rezultati pokazuju da nema vidljive razlike u nivou ekspresije MIF i da je ovaj protein lokalizovan u citoplazmi svih ispitivanih ćelija (Slika 25).



Slika 25. Ekspresija MIF u HTR-8/SVneo ćelijama normalnog trofoblasta (A) i horiokarcinomskim JAr (B) i Jeg-3 (C) ćelijama. Imunofluorescentno bojenje MIF (zeleno). Jedra su bojena 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI, plavo).

4.3.4. Ekspresija MIF u HTR-8/SVneo ćelijama normalnog trofoblasta i horiokarcinomskim JAr i Jeg-3 ćelijama

Western blot metodom ispitana je ekspresija MIF proteina u ukupnim ćelijskim lizatima. Utvrđeno je da se relativna ekspresija MIF ne razlikuje između HTR-8/SVneo ćelija normalnog trofoblasta i horiokarcinoma JAr i Jeg-3 ćelijama (**Slika 26**).

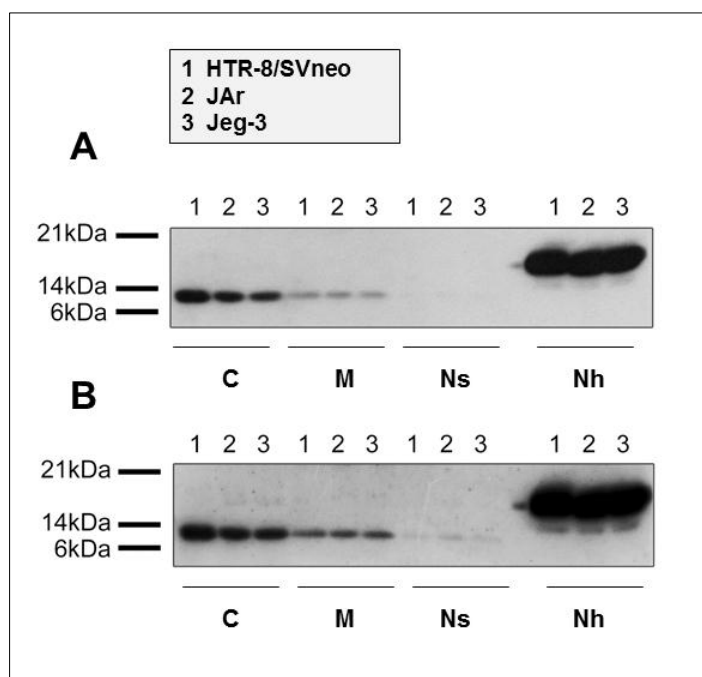


Slika 26. Relativna ekspresija MIF u ukupnim lizatima horiokarcinoma JAr i Jeg-3 ćelija u odnosu na HTR-8/SVneo ćelije normalnog trofoblasta. (A) Rezultati su dobijeni Western blot metodom kojoj je prethodila SDS-PAGE i prikazani su kao procenat u odnosu na vrednost dobijenu za HTR-8/SVneo ćelijsku liniju + SEM; n = 3; (B) Reprerzentativni imunoblot.

4.3.5. Subćelijska distribucija MIF u HTR-8/SVneo ćelijama normalnog trofoblasta i horiokarcinomskim JAr i Jeg-3 ćelijama

Subćelijska distribucija MIF ispitivana je Western blot metodom. MIF je, u skladu sa očekivanjem, bio eksprimiran u najvećoj meri u citoplazmatskoj frakciji, a pristustvo trake između 6 i 14 kDa koja odgovara molekularnoj masi MIF od 12.5 kDa utvrđeno je i u membranskoj kao i u dvema nuklearnim frakcijama – solubilnoj i hromatinskoj. U hromatinskoj nuklearnoj subćelijskoj frakciji uočena je i intenzivna traka proteina molekularne mase između 14 i 21 kDa, u ovom trenutku nepoznatog

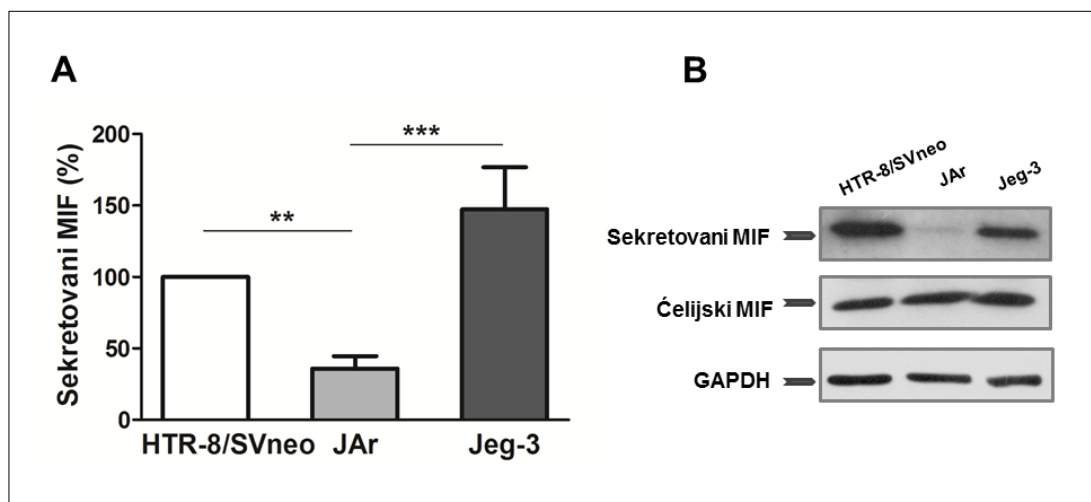
porekla. Subćelijska distribucija MIF nije se razlikovala između ispitivanih HTR-8/SVneo ćelija i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelija (**Slika 27**).



Slika 27. Subćelijska distribucija MIF u HTR-8/SVneo ćelijama normalnog trofoblasta i horiokarcinomskim JAr i Jeg-3 ćelijama. Predstavljen je reprezentativni imunoblot posle kraće (A) i duže (B) ekspozicije dobijen Western blot metodom nakon razdvajanja proteina pomoću SDS-PAGE. C – citoplazmatska, M – membranska, Ns – nuklearna solubilna, Nh – nuklearna hromatinska subćelijska frakcija.

4.3.6. Nivo sekretovanog MIF u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija normalnog trofoblasta i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelija

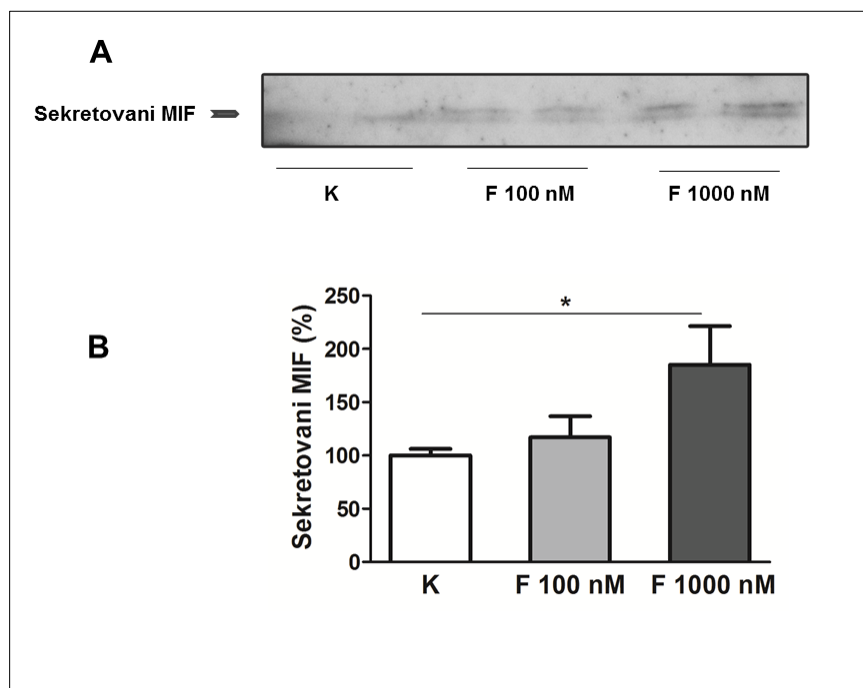
Western blot metodom utvrđeno je da je nivo sekretovanog MIF u kondicioniranim medijumima JAr ćelija bio značajno niži u odnosu na nivo sekretovanog MIF od strane HTR-8/SVneo i Jeg-3 ćelija (HTR-8/SVneo 100%, JAr $35.9\% \pm 8.7$, Jeg-3 147.3 ± 29.5 , HTR-8/SVneo vs JAr $p < 0.01$, HTR-8/SVneo vs Jeg-3 $p < 0.001$) (**Slika 28A**). Uporedo je provereno da li postoji razlika u nivou ekspresije MIF u odgovarajućim ukupnim ćelijskim lizatima Western blot metodom i još jednom je potvrđeno da se ne razlikuje intracelularna ekspresija MIF između ispitivanih ćelija (**Slika 28B**).



Slika 28. Relativni nivo sekretovanog MIF proteina u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija normalnog trofoblasta i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelija. (A) Rezultati su dobijeni Western blot metodom kojoj je prethodila SDS-PAGE i prikazani su kao procenat u odnosu na vrednost dobijenu za HTR-8/SVneo ćelije + SEM; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 3$. (B) Prikazani su reprezentativni imunoblotovi kondicioniranih medijuma (sekretovani MIF), odgovarajućih ukupnih ćelijskih lizata (ćelijski MIF) i GAPDH ukupnih ćelijskih lizata istih ćelija.

4.3.7. Uticaj antagoniste estrogenskih receptora Fulvestranta na sekreciju MIF od strane JAr ćelija

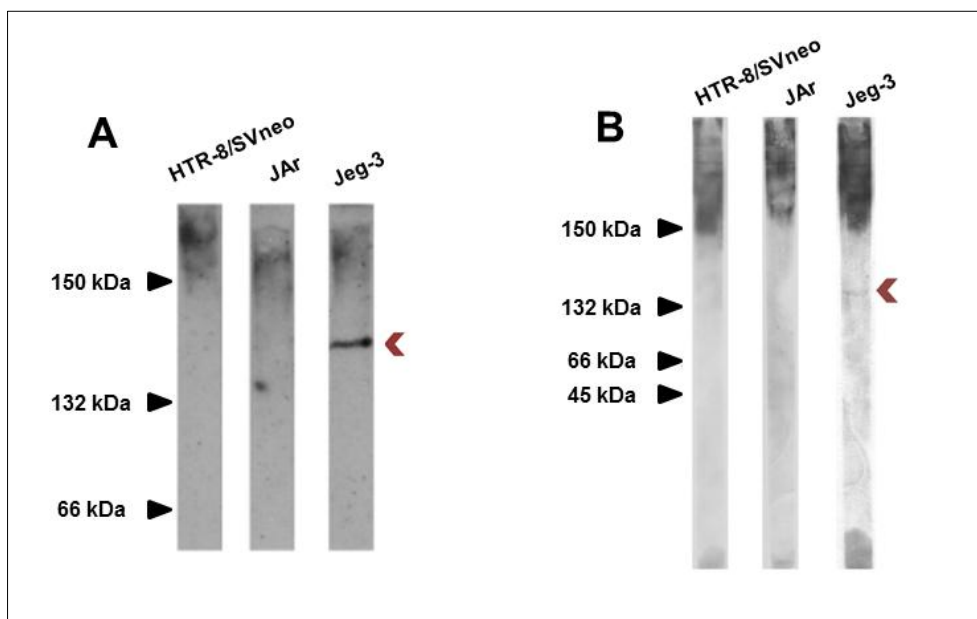
Iz literature je poznato da estrogen smanjuje sekreciju MIF u kulturi eksplanata placente prvog trimestra (159). S obzirom na to da JAr ćelije sintetišu estrogen (177), želeli smo da ispitamo da li bi inhibicija autokrine aktivnosti ovog hormona mogla uticati na nivo sekrecije MIF. JAr ćelije su tretirane 24 h Fulvestrantom, antagonistom estrogenskih receptora, nakon čega je utvrđen nivo sekrecije MIF u kondicioniranim medijumima Western blot metodom. Rezultati pokazuju da pod uticajem 1000 nM Fulvestranta dolazi do značajnog povećanja sekrecije MIF u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) dok Fulvestrant u koncentraciji od 100 nM nije doveo do promene (kontrola $100\% \pm 6.1$, 100 nM Fulvestrant 116.9 ± 19.9 , 1000 nM Fulvestrant $185.1\% \pm 36.2$) (Slika 29).



Slika 29. Uticaj antagoniste estrogenskih receptora Fulvestranta na sekreciju MIF u kondicioniranim medijumima horiokarcinomskih JAR ćelija. (A) Reprerativni imunoblot kondicioniranih medijuma JAR ćelija nakon 24 h tretmana 100 nM i 1000 nM Fulvestrantom. (B) Relativni nivo sekretovanog MIF u kondicioniranim medijumima JAR ćelija nakon 24 h tretmana 100 nM i 1000 nM Fulvestrantom. Rezultati su dobijeni Western blot metodom kojoj je prethodila SDS-PAGE i prikazani su kao procenat u odnosu na vrednosti dobijene za kontrolne ćelije (K) + SEM; * $p < 0.05$, $n = 3$.

4.3.8. Ispitivanje molekularnih formi MIF u ukupnim ćelijskim lizatima HTR-8/SVneo ćelija normalnog trofoblasta i horiokarcinomskih JAR i Jeg-3 ćelija

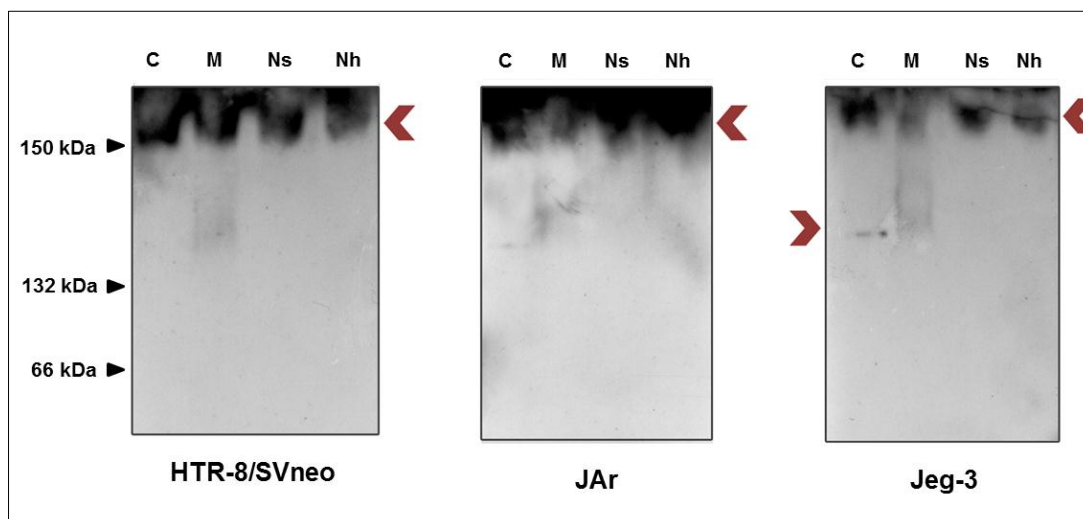
Molekulske forme/komplekse MIF u ukupnim ćelijskim lizatima ispitivali smo Western blot metodom nakon elektroforetskog razdvajanja proteina u nativnim uslovima. Dobijeni imunoblotovi pokazuju da se MIF u ćelijskim lizatima sve tri ispitivane ćelijske linije nalazi uglavnom u kompleksima molekulske mase veće od 150 kDa (**Slika 31**). Takođe, samo u slučaju Jeg-3 ćelija utvrđeno je stalno prisustvo proteinskog kompleksa molekulske mase oko 145 kDa koji je bio odsutan ili se retko i u manjem intenzitetu uočavao u lizatima HTR-8/SVneo i JAR ćelija (**Slika 30**).



Slika 30. Nativne molekulske forme MIF proteina u ukupnim ćelijskim lizatima HTR-8/SVneo ćelija normalnog trofoblasta i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelija. Reprezentativni imunoblot ukupnih ćelijskih lizata ispitivanih ćelija dobijen Western blot metodom kojoj je prethodila nativna PAGE na 6% (A) odnosno 4-20% gradijentnom (B) gelu. Strelicom je označena traka specifična za lizate Jeg-3 ćelija.

4.3.9. Ispitivanje molekulskih formi MIF u subćelijskim frakcijama HTR-8/SVneo ćelija normalnog trofoblasta i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelija

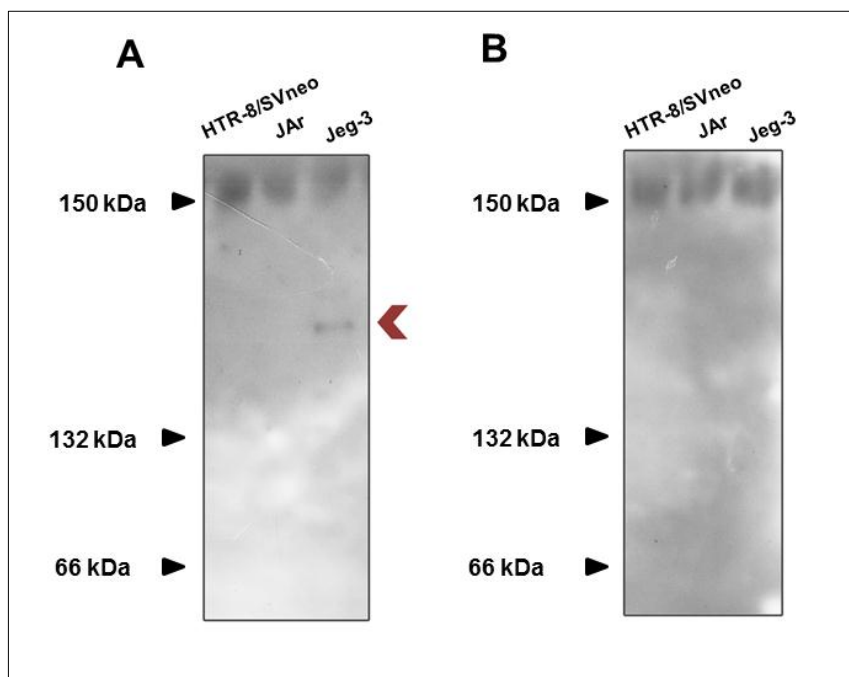
Dalja ispitivanja nativnih molekulskih formi MIF u subćelijskim frakcijama pokazala su da se proteinski kompleks molekulske mase oko 145 kDa, karakterističan za Jeg-3 ćelije, javlja u citoplazmatskoj frakciji. Difuzna traka manjeg intenziteta u rasponu od 145 do 150 kDa bila je prisutna u membranskoj frakciji sva tri ćelijska tipa. U svim ispitivanim subćelijskim frakcijama sve tri ćelijske linije MIF je uglavnom bio detektovan u okviru kompleksa molekulskih masa većih od 150 kDa (Slika 31).



Slika 31. Nativne molekulske forme MIF proteina u subćelijskim frakcijama HTR-8/SVneo ćelija normalnog trofoblata i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelija. Reprezentativni imunoblot subćelijskih frakcija ispitivanih ćelijskih linija dobijen Western blot metodom nakon razdvajanja pomoću PAGE u nativnim uslovima. Strelicom je označena traka koja je bila stalno prisutna u citoplazmatskoj frakciji Jeg-3 i povremeno u citoplazmatskoj frakciji JAr ćelija. C – citoplazmatska, M – membranska, Ns – nuklearna solubilna, Nh – nuklearna hromatinska subćelijska frakcija.

4.3.10. Ispitivanje molekularnih formi sekretovanog MIF u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija normalnog trofoblata i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelija

Sekretovani MIF u kondicioniranim medijumima ispitivanih ćelijskih linija je detektovan u kompleksima molekularnih masa većih od 150 kDa. Specifičan kompleks molekularne mase oko 145 kDa nije detektovan u svim ispitivanim uzorcima kodnacioniranih medijuma Jeg-3 ćelija (**Slika 32**). Rezultati su dobijeni Western blot metodom nakon elektroforetskog razdvajanja proteina u nativnim uslovima.



Slika 32. Nativne molekulske forme sekretovanog MIF proteina u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija normalnog trofoblata i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelija. Reprezentativni imunoblotovi kondicioniranih medijuma dobijeni Western blot metodom kojoj je prethodila nativna PAGE. Predstavljen je imunoblot kondicioniranih medijuma Jeg-3 ćelija gde je detektovana specifična traka koja je označena strelicom (A) i imunoblot kondicioniranih medijuma u kojima nije detektovana specifična molekulska forma MIF (B).

DISKUSIJA

Pravilna implantacija embriona u tkivo materice i adekvatan razvoj i funkcionisanje placente, presudni su za uspešno uspostavljanje trudnoće i pravilan rast i razvoj fetusa. U toku prvog trimestra trudnoće, EVT vrši invaziju u tkivo decidue i remodeluje spiralne arterije uterusa. Invazija trofoblasta regulisana je nizom faktora koje sekretuju ćelije u zoni interakcije tkiva majke i fetusa. Značajnu ulogu u regulaciji funkcije trofoblasta imaju proinflamatorni citokini koje sekretuju imunokompetentne ćelije decidue ali i stromalne decidualne ćelije kao i sam trofoblast (60,68,70,178).

MIF je multifunkcionalni citokin sa značajnom proinflamatornom ulogom (95,106,126). MIF ekspimiraju decidualne stromalne ćelije i dNK ćelije dok je u placenti lokalizovan uglavnom u vilusnom citotrofoblastu i u ćelijskim stubovima EVT (92,100,165). MIF decidualnog i fetalnog porekla učestvuje u procesima značajnim za placentaciju i trudnoću (163–165).

Jedan od ciljeva ovog rada bilo je ispitivanje uloge endogenog trofoblastnog MIF u funkciji EVT ćelija. Korišćenjem specifične siRNA uspešno je utišana ekspresija MIF u HTR-8/SVneo ćelijama na nivou iRNK i na proteinskom nivou. Pomoću funkcionalnog *in vitro* testa invazije kroz sloj Matrigela utvrdili smo da je invazija HTR-8/SVneo ćelija bila smanjena nakon utišavanja ekspresije MIF. Trofoblast vrši invaziju kroz tkivo decidue razgrađujući ECM proteaznim enzimima koje sekretuje, dok posredstvom integrina ostvaruje kontakt sa komponentama razgrađenog ECM što dalje promovise invaziju (18–20). Nivo MMP2 i MMP9 u kondicioniranim medijumima kao i ekspresija integrinske subjedinice α_1 bili su značajno niži nakon utišavanja MIF u HTR-8/SVneo ćelijama. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim rezultatima naše grupe koji pokazuju da inhibicija enzimske aktivnosti MIF pomoću ISO-1 dovodi do smanjenja ekspresije MMP2, MMP9 i integrina α_1 . Sa druge strane, rekombinantni MIF je povećavao ekspresiju ovih proteina (69). Naši prethodni rezultati ukazuju na to da bi MIF mogao predstavljati važan faktor decidualnog porekla koji pozitivno reguliše trofoblastnu invaziju, s obzirom na to da je dodatak ISO-1 u kondicionirane medijume decidualnih stromalnih ćelija neutralisao njihovo stimulatívno dejstvo na ovaj proces. Na osnovu naših prethodnih rezultata, kao i rezultata ovog rada, može se zaključiti da je pored parakrinog, i autokrino dejstvo MIF značajno za regulaciju procesa trofoblastne invazije, i to posredstvom regulacije ekspresije MMP2, MMP9 i integrina α_1 . Takođe, i drugi, u ovom trenutku neispitani modulatori trofoblastne invazije bi mogli biti pod

uticajem dejstva MIF. S obzirom na to da je iz literature poznato da MIF poseduje značajne uloge i unutar same ćelije (anti-apoptotska, endonukleazna, šaperonska (91,130,134)), nije isključen ovakav način delovanja ni u trofoblastu. Dalja istraživanja mogla bi otkriti dodatni mehanizam delovanja ovog multifunkcionalnog citokina.

Utišavanje ekspresije MIF putem siRNA ili inhibicija njegove tautomerazne aktivnosti pomoću ISO-1 dovodila je do smanjene migracije i/ili invazije i drugih tipova ćelija kao što su različite kancerske ćelije čoveka (152–155) što potvrđuje značaj MIF u regulaciju invazivnih svojstava različitih tipova ćelija.

U toku prvog trimestra, EVT transformiše zidove spiralnih arterija decidue (179). Kao rezultat remodelovanja nastaju krvni sudovi širokog promera koji obezbeđuju stalni dotok velikih količina majčine krvi bogate nutrijentima neophodnih za pravilan razvoj fetusa i uspešan ishod trudnoće. Proces transformacije spiralnih arterija obuhvata degradaciju ECM, apoptozu endotelnih i mišićnih ćelija zida ovih krvnih sudova i zamenu endotelnog sloja vEVT ćelijama (27) U toku ovog procesa, EVT poprima svojstva endotela (28,57). Promene u regulaciji epitelo-endotelne tranzicije trofoblasta i neadekvatna transformacija decidualnih spiralnih arterija dovodi se u vezu sa ozbiljnim patološkim stanjima u trudnoći kao što su preeklampsija i zastoj u rastu ploda (36–38).

U ovom radu smo ispitivali ulogu endogenog trofoblastnog MIF u procesu remodelovanja spiralnih arterija prateći epitelo-endotelnu tranziciju trofoblastnih HTR-8/SVneo ćelija i interakciju ovih ćelija sa endotelom. Korišćenjem *in vitro* testa formiranja tubula ispitivali smo diferencijaciju HTR-8/SVneo ćelija ka endotelnom fenotipu nakon utišavanja MIF. U kontaktu sa koncentrovanim Matrigelom, ćelije EVT poprimaju endotelna svojstva i poput endotelnih ćelija, formiraju tubularnu mrežu koja podseća na kapilarne strukture (180,181). Mnogi procesi koji se odvijaju tokom *in vitro* tubulogeneze verno podražavaju deo mehanizma angiogeneze *in vivo* (181). Rezultati naših istraživanja ukazuju na značaj MIF u procesu trofoblastne diferencijacije ka endotelnom fenotipu. Tubule koje su formirale ćelije sa utišanom ekspresijom *MIF* bile su značajno kraće i manje razgranate u poređenju sa tubulama koje su formirale kontrolne ćelije. Ovi rezultati su u skladu sa podacima iz literature koji pokazuju da MIF stimuliše formiranje tubularnih struktura endotelnih ćelija u testovima angiogeneze *in vitro* i *in vivo* (132,182)

Tokom transformacije spiralnih arterija sloj endotelnih ćelija nestaje i biva zamenjen vEVT ćelijama. Još uvek nije potpuno rasvetljen mehanizam koji leži u osnovi ovog procesa. Poznato je da EVT ćelije poprimaju svojstva endotelnih ćelija, integrišu se u sloj endotela i postupno ga zamenjuju prolazno koegzistirajući u zidu spiralnih arterija (28,183). Korišćenjem metode ko-kulture ispitali smo ulogu MIF u interakciji trofoblastnih HTR-8/SVneo i endotelnih HUVEC ćelija. Nakon 24 h ko-kulture, utvrdili smo da su se trofoblastne ćelije nakon utišavanja ekspresije *MIF* značajno manje integrisale u monosloj endotelnih HUVEC ćelija. Dobijeni rezultati ukazuju na to da bi MIF mogao učestvovati u regulaciji interakcije trofoblasta i endotelnih ćelija. Primarne HUVEC ćelije se široko koriste kao model sistem kako u istraživanju fiziologije endotelnih ćelija tako i u istraživanjima remodelovanja spiralnih arterija tokom trudnoće (42,184,185). Literaturni podaci pokazuju da se HUVEC ćelije ponašaju slično decidualnim endotelnim ćelijama, kada je u pitanju interakcija sa trofoblastom, što opravdava njihovo korišćenje kao model sistema u ovoj oblasti istraživanja (43).

Dalje smo želeli da ispitamo na koji način utišavanje ekspresije *MIF* remeti interakciju trofoblasta i endotela. Iako mehanizam koji leži u osnovi degradacije sloja endotela spiralnih arterija nije još uvek u potpunosti rasvetljen, poznato je da ovaj proces obuhvata apoptozu endotelnih ćelija (43,184,186). Solubilni produkti HTR-8/SVneo ćelija nakon utišavanja ekspresije *MIF* koji su prisutni u kondicioniranom medijumu nisu uticali na vijabilnost endotelnih HUVEC ćelija. Ovi rezultati ukazuju na to da trofoblastni MIF nema uticaj na sekreciju faktora koji bi mogli indukovati apoptozu endotelnih ćelija. Da li solubilni faktori trofoblastnog porekla menjaju neka druga svojstva endotela koja bi doprinela interakciji ova dva tipa ćelija i da li MIF učestvuje u tim potencijalnim efektima potrebno je dalje ispitati.

Poznato je da EVT prolazi kroz epitelno-endotelnu tranziciju koja između ostalog obuhvata promenu repertoara adhezivnih molekula. Diferencirane vEVT ćelije ekspimiraju adhezivne molekule karakteristične za endotel (VE-kadherin, PECAM-1, integrinsku subjedinicu α_4 , integrin $\alpha_v\beta_3$) čime je omogućena interakcija endotela spiralnih arterija i vEVT i olakšana invazija i migracija ovih ćelija kroz endotel (28,57). Primećeno je da interakcija trofoblasta i endotela podseća na regrutovanje leukocita iz krvi na mesto inflamacije (187). Aktivirani leukociti i endotelne ćelije ekspimiraju

specifične adhezivne molekule koji omogućavaju interakciju ova dva tipa ćelija (188). Pretpostavlja se da bi mehanizmi koji se nalaze u osnovi regulacije interakcije endotela sa trofoblastom i leukocitima mogli biti međusobno slični (187).

Multhaup i saradnici su nedavno pokazali da je N-kadherin važan učesnik u interakciji trofoblastnih i endotelnih ćelija (42). Oni su metodom ko-kulture ispitivali interakciju više trofoblastnih ćelijskih linija (HTR-8/SVneo, Jeg-3, AC-1M32 i AC-H3P) sa tubularnim strukturama HUVEC ćelija. HTR-8/SVneo ćelije su aktivno migrirale ka HUVEC ćelijama i jedine u potpunosti bile kolokalizovane sa tubularnim mrežama endotelnih ćelija. Ispitujući ekspresiju različitih adhezivnih molekula, autori su ustanovili da od ispitivanih trofoblastnih linija jedino HTR-8/SVneo ćelije ekspimiraju N-kadherin. Daljim istraživanjem su ustanovili da utišavanje ekspresije N-kadherina specifičnom siRNA dovodi do smanjenja interakcije HTR-8/SVneo i HUVEC ćelija potvrđujući veliki značaj ovog kadherina za dati tip međućelijske interakcije.

Na osnovu ovih nalaza i literaturnih podataka o ulozi MIF u regulaciji ekspresije adhezivnih molekula koji učestvuju u interakciji leukocita i endotela (119,136), ispitivali smo da li bi utišavanje ekspresije *MIF* u HTR-8/SVneo ćelijama moglo uticati na ekspresiju N-kadherina. Naši rezultati su pokazali da je ovaj kadherin zaista manje ispoljen nakon utišavanja ekspresije *MIF* što ukazuje na to da bi MIF mogao uticati na interakciju trofoblasta i endotela putem promene ekspresije N-kadherina.

N-kadherin učestvuje i u EMT trofoblasta i posreduje u procesu trofoblastne invazije (55). S obzirom na to, smanjena ekspresija N-kadherina nakon utišavanja MIF mogla bi dodatno da objasni mehanizam delovanja MIF na invazivna svojstva trofoblasta.

Originalni rezultati u ovom radu potvrđuju značaj MIF za procese koji se odigravaju u ranoj trudnoći. MIF ima značajnu ulogu u procesu remodelovanja spiralnih arterija, učestvuje u regulaciji diferencijacije trofoblasta ka endotelnom fenotipu i u regulaciji funkcionalnih svojstava vEVT. Dalja ispitivanja uloge MIF u ovim procesima i rasvetljavanje specifičnog mehanizma delovanja ovog citokina mogla bi doprineti boljem razumevanju procesa remodelovanja spiralnih arterija kao i patologija trudnoće koje su vezane za poremećaj funkcije EVT.

Jedan od faktora koji doprinose poremećaju funkcije EVT i placente jeste intrauterina infekcija u toku trudnoće (61,62). Mehanizmi koji povezuju infekciju sa promenom funkcije EVT još uvek nisu u potpunosti poznati. Infekcije urogenitalnog trakta izazvane gram-negativnim bakterijama dovode se u vezu sa komplikacijama u trudnoći (61).

Imunokompetente ćelije prepoznaju prisustvo patogena preko TLR. Pomoću TLR-4 ćelije prepoznaju LPS, komponentu spoljašnje membrane gram-negativnih bakterija koja izaziva snažan imunski odgovor. S obzirom na to da ekspimiraju TLR, uključujući i TLR-4, trofoblastne ćelije mogu direktno učestvovati u odgovoru na infekciju u zoni interakcije tkiva majke i fetusa (71,189,190). U prisustvu LPS primarne citotrofoblastne ćelije prvog trimestra povećano sekretuju IL-6, IL-8 i druge proinflamatorne citokine (71,191,192). Naša ispitivanja potvrdila su ovo stimulatorno dejstvo LPS na sekreciju IL-6 i IL-8 od strane ekstravilusnih trofoblastnih HTR-8/SVneo ćelija. U ovom radu pokazano je da MIF takođe ima ulogu u citokinskom odgovoru HTR-8/SVneo ćelija na infekciju. Naime, ekspresija i sekrecija ovog citokina bile su povećane nakon tretmana ovih ćelija LPS.

MIF je važan proinflamatorni citokin. U odgovoru na LPS makrofagi sekretuju MIF koji dalje aktivira mehanizme urođenog i stečenog imunskog sistema (95). Pokazano je da je MIF medijator sepse i septičkog šoka (84,193). Utvrđeno je da ćelije adenohipofize sekretuju MIF kao odgovor na LPS doprinoseći sistemskom povećanju koncentracije ovog citokina i razvoju sepse (103). Visok nivo serumskog MIF povezan je sa letalnim ishodom usled septičkog šoka (194,195).

Lokalno povećanje koncentracije proinflamatornih citokina u zoni interakcije majke i fetusa usled infekcije može narušiti strogo kontrolisano okruženje u kome se odvija invazija EVT i dovesti do poremećaja funkcije ovih ćelija i čak kompromitovati ishod trudnoće. S obzirom na to da učestvuje u imunskom odgovoru na infekciju kao i u regulaciji mnogih aspekata funkcije EVT, povećano prisustvo MIF bi moglo doprineti poremećaju funkcije trofoblastnih ćelija usled infekcije.

MIF se dovodi u vezu sa mnogim kancerima. Utvrđena je njegova uloga u različitim aspektima kancerogeneze i progresa kancera. Za mnoge kancere je karakteristična povećana ekspresija MIF a kod nekih je povećana i ekspresija receptora za MIF (77). MIF stimuliše proliferaciju, migraciju i invaziju ćelija (69,141). Takođe, obavljajući antiapoptotsku ulogu MIF promoviše preživljavanje kancerskih ćelija (142). S obzirom na značajnu ulogu MIF u različitim fazama razvoja kancera, smatra se da bi inhibicija MIF mogla biti potencijalna antitumorska terapija (152,196).

U ovom radu smo ispitivali sekreciju i ekspresiju MIF i njegovih receptora u HTR-8/SVneo ćelijama normalnog trofoblasta i horiokarcinomskim JAr i Jeg-3 ćelijama. Ekspresija *MIF* gena na nivou iRNK i na nivou proteina nije se razlikovala između ispitivanih ćelija. Međutim, postojale su značajne razlike u ekspresiji gena za receptore za MIF na nivou iRNK. Ćelije obe horiokarcinomske linije su značajno više ekspimirale CD74, klasični receptor za MIF, u poređenju sa ćelijama normalnog trofoblasta. Takođe, nivo ekspresije CXCR2, jednog od alternativnih receptora za MIF, bio je značajno viši u Jeg-3 ćelijama u odnosu na HTR-8/SVneo ćelije. Sličan odnos je uočen i između JAr i HTR-8/Svneo ćelija, međutim ova razlika u ekspresiji CXCR2 nije bila statistički značajna. Povećana ekspresija *CD74* i *CXCR2* kod horiokarcinomskih ćelija mogla bi ukazati na povećanu reaktivnost ovih ćelija na MIF, odnosno na potencijalno povećanu aktivaciju signalnih puteva nakon vezivanja MIF za ove receptore. Potrebno je dalje ispitati funkcionalnu ulogu ovog povećanja u ekspresiji datih receptora. Pokazano je da i drugi kanceri kao što su kancer dojke, glioblastom, gastrointestinalni kaceri, kancer prostate, ekspimiraju u većoj meri CD74 (196–199). Smatra se da bi povećana ekspresija CD74 u tkivu kancera mogla biti i prognostički marker (197,200). Blokiranje aktivnosti CD74 redukuje invazivnost ćelija i rast tumora kancera prostate (196) i aktivira imunski odgovor protiv melanoma (201). Jeg-3 ćelije su povećano ekspimirale i *CXCR2*, gen za alternativni receptor za MIF, što je karakteristično i za druge tipove kancera kao što je kancer larinksa, glioblastom i druge (199,202,203). Povećana ekspresija CXCR2 utvrđena je u metastazama kolorektalnog kancera u jetri i koreliše sa lošom prognozom bolesti kod različitih tipova kancera (199,202,203).

Subćelijska distribucija MIF bila je slična u slučaju sve tri ispitivanje ćelijske linije. Kao što je i očekivano, MIF je u najvećoj meri bio prisutan u citoplazmatskoj, ali

je detektovan i u ostalim ispitivanim subćelijskim frakcijama. Poznato je da je MIF konstitutivno eksprimiran u mnogim ćelijama i da se nalazi u citoplazmatskim vezikularnim depovima odakle se sekretuje pod uticajem različitih stimulusa kao što su LPS, hipoksija i drugi (103,108). Prisustvo MIF u nuklearnoj frakciji detektovano je i ranije u različitim tipovima ćelija. Poznato je da MIF ima endonukleaznu aktivnost unutar nukleusa koja je povezana sa partanatosom, programiranom ćelijskom smrću (91). Takođe, Djudjaj i saradnici su utvrdili prisustvo MIF u nuklearnoj frakciji ćelija bubrega mišjeg modela progresivne bolesti bubrega (101). Prisustvo MIF u membranskoj subćelijskoj frakciji bi moglo biti posledica interakcije MIF sa transmembranskim proteinima i/ili proteinima koji su vezani za membranu. Takođe, moguće je da je MIF detektovan u trenutku fuzije sekretornih vezikula sa ćelijskom membranom.

Kao što je pomenuto, nivo ekspresije intracelularnog MIF nije se razlikovao među ispitivanim ćelijskim linijama. Međutim, naši rezultati pokazuju da JAr ćelije značajno manje sekretuju MIF u poređenju sa drugim ispitivanim ćelijama. Ietta i saradnici su pokazali da E₂ smanjuje sekreciju MIF bez uticaja na ekspresiju ovog proteina u eksplantima placente prvog trimestra (159). Pokazali su da E₂ smanjuje ekspresiju ABCA1 membranskog transportnog proteina (159) koji je uključen u sekreciju MIF (110) i da na taj način ostvaruje uočene efekte.

S obzirom na to da JAr ćelije sintetišu E₂ (177) zanimalo nas je da li bi smanjena sekrecija MIF mogla biti posledica autokrinog dejstva E₂. Tretirajući JAr ćelije Fulvestrantom, antagonistom estrogenskih receptora, pokazali smo da inhibicija autokrinog dejstva E₂ zaista dovodi do povećanja nivoa sekretovanog MIF. Ovo verovatno nije jedini mehanizam koji bi mogao biti uzrok niske sekrecije MIF od strane JAr ćelija. Iako sintetišu E₂ i eksprimiraju estrogenske receptore (204,205), nivo MIF u kondicioniranom medijumu Jeg-3 ćelija nije bio niži u odnosu na medijume HTR-8/SVneo ćelija. U osnovi razlike u sekreciji MIF između Jar i Jeg-3 ćelija bi moglo biti manje izraženo autokrino dejstvo E₂, s obzirom na to da je pokazano da Jeg-3 ćelije proizvode znatno manje ovog steroidnog hormona u odnosu na JAr ćelije (204).

Ispitivanjem prisustva molekulskih formi MIF proteina u nativnim uslovima pokazali smo da se intracelularni i sekretovani MIF uglavnom javljaju u proteinskim kompleksima molekulskih težina većih od 150 kDa. Uočena je proteinska traka

molekulske težine od oko 140-145 kDa koja je bila karakteristična za Jeg-3 ćelije. Ovaj kompleks je detektovan u ukupnim ćelijskim lizatima, i u citoplazmatskoj subćelijskoj frakciji Jeg-3 ćelija. U membranskoj subćelijskoj frakciji sve tri ispitivane ćelijske linije detektovana je difuzna traka veće molekulske težine koja ukazuje na to da MIF interaguje sa proteinima ćelijske ili unutarćelijskih membrana. Proteinski kompleks karakterističan za Jeg-3 ćelije detektovan je u delu kondicioniranih medijuma ove ćelijske linije.

Naša istraživanja su pokazala da se MIF u trofoblastnim ćelijama nalazi u okviru proteinskih kompleksa. Druge istraživačke grupe su takođe utvrdile na različitim uzorcima da se MIF nalazi u kompleksima visokih molekulskih težina. U homogenatima bešike pacova MIF je detektovan u kompleksima molekulske težine između 60 do 500 kDa (206), u intraluminalnoj tečnosti bešike pacova od 200 do 500 kDa (207) i u serumu čoveka od 150-500 kDa (208).

Za sada nisu poznati molekulski partneri kompleksa koje MIF gradi u trofoblastnim ćelijama. Iz literature je poznato da ovaj citokin ostvaruje interakciju sa mnogim proteinima. Pokazano je da MIF interaguje sa p115 (111), HIF-1 α (209), p53 (210), JAB1 (211) i mnogim drugim proteinima čime se ostvaruje uloga MIF u inhibiciji apoptoze, regulaciji procesa aktiviranih hipoksijom i drugim procesima.

Iako obe predstavljaju horiokarcinomske linije, JAr i Jeg-3 ćelije se razlikuju po nekim karakteristikama. Jeg-3 ćelije pokazuju veći metastatski potencijal od JAr ćelija (212). U skladu sa tim, Jeg-3 ćelije u znatno većoj meri ekspimiraju proteine koji se dovode u vezu sa metastatskim potencijalom kao što su fibronektin, MMP2, kaveolin, VEGF-B, u poređenju sa JAr ćelijama (212). Poznato je da MIF ima ulogu u formiranju metastaza različitih kancera (151). Detektovane razlike u molekulskim kompleksima koje MIF ostvaruje u JAr i Jeg-3 ćelijama odnosno razlike u vezujućim proteinskim partnerima MIF, potencijalno bi mogle ležati u osnovi različitog metastatskog potencijala.

Na osnovu iznetih rezultata i literaturnih podataka jasno je da bi bilo značajno ispitati molekulske partnere u kompleksima koje formira MIF u ćelijama trofoblasta i ispitati da li molekulski partneri MIF u kompleksu karakterističnom za Jeg-3 ćelije doprinose njihovom metastatskom potencijalu i da li na još neki način utiču na funkcionalna svojstva ovih ćelija. Fokus daljih istraživanja biće usmeren u tom pravcu.

Rezultati ovog rada ukazuju na nedvosmislen značaj MIF za invazivna svojstva trofoblasta kao i značaj ovog citokina funkciju endovaskularnog trofoblasta. Pokazana je i uloga MIF u citokinskom odgovoru trofoblastnih ćelija u *in vitro* modelu infekcije kao i razlika u ekspresiji i sekreciji MIF između ćelija normalnog trofoblasta i maligno transformisanih trofoblastnih ćelija. Podrobnija ispitivanja funkcionalnih svojstava MIF u trofoblastu mogla bi doprineti dizajnu novih terapijskih pristupa u lečenju različitih patoloških stanja povezanih sa ovim citokinom.

ZAKLJUČCI

- Trofoblastni MIF doprinosi invazivnosti ekstravilusnog trofoblata *in vitro*
- Mehanizam delovanja MIF na invazivna svojstva HTR-8/SVneo ćelija uključuje regulaciju ekspresije MMP2, MMP9, integrinske subjedinice α_1 i N-kadherina
- Diferencijacija HTR-8/SVneo ćelija u endotelni fenotip je smanjena nakon utišavanja ekspresije *MIF*
- MIF doprinosi sposobnosti integracije HTR-8/SVneo ćelija u monosloj endotelnih HUVEC ćelija
- Smanjenje ekspresija N-kadherina nakon utišavanja ekspresije *MIF* u HTR-8/SVneo ćelijama ukazuje na jedan od mogućih mehanizama kojim MIF utiče na interakciju trofoblata i endotela

- Prisustvo lipopolisaharida kod HTR-8/SVneo ćelija indukovao je povećanje ekspresije i sekrecije MIF što ukazuje na moguće učešće MIF u citokinskom odgovoru trofoblata na infekciju kod čoveka

- Nema značajnih razlika u ekspresiji MIF između normalnih trofoblastnih HTR-8/SVneo i horiokarcinomskih JAr i Jeg-3 ćelija
- Ekspresija gena za receptore MIF na nivou iRNK je značajno viša u horiokarcinomskim u odnosu na HTR-8/SVneo ćelije. Obe horiokarcinomske ćelijske linije značajno više eksprimiraju *CD74* u odnosu na HTR-8/SVneo ćelije. Ekspresija *CXCR2* je značajno viša u horiokarcinomskim Jeg-3 ćelijama u odnosu na HTR-8/SVneo ćelije
- JAr ćelije značajno manje sekretuju MIF u poređenju sa druge dve ispitivane ćelijske linije. Autokrini aktivnost estradiola uključena je u inhibiciju sekrecije MIF od strane JAr ćelija
- Intracelularni i sekretovani MIF detektovan je uglavnom u vidu proteinskih kompleksa molekulskih težina većih od 150 kDa
- Detektovani su proteinski kompleksi molekulske težine od oko 140-145 kDa karakteristična za Jeg-3 ćelije
- Razlika u ekspresiji receptora za MIF i nativnim molekulskim formama MIF između ćelija normalnog trofoblata i horiokarcinomskih ćelija može ukazivati na značaj MIF za malignu transformaciju trofoblata čoveka

- ❖ Dobijeni rezultati ovog rada ukazuju na značaj MIF za funkcionalna svojstva trofoblasta čoveka. Odstupanja od fiziološkog nivoa MIF u tkivima zone interakcije majke i fetusa moglo bi biti uključeno u razvoj određenih patoloških stanja u trudnoći. Naši rezultati ukazuju na to da bi ovaj citokin mogao imati ulogu u procesu remodelovanja spiralnih arterija kao i u citokinskom odgovoru trofoblasta na infekciju i u malignoj transformaciji trofoblasta. Dalja ispitivanja funkcionalnih svojstava MIF u trofoblastu i trudnoći bi mogla doprineti boljem razumevanju etiologije različitih patoloških stanja kao i razvoju novih terapijskih pristupa u njihovom lečenju

LITERATURA

1. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Pathology of the Human Placenta. 6th Edition. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012.
2. Zeldovich VB, Bakardjiev AI. Host defense and tolerance: unique challenges in the placenta. *PLoS Pathog.* 2012;8(8):e1002804.
3. Lonergan T, Bavister B, Brenner C. Mitochondria in stem cells. *Mitochondrion.* 2007;7(5):289.
4. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med.* 2001 Nov 8;345(19):1400–8.
5. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest.* 2004 Sep 15;114(6):744–54.
6. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology - 12th Edition.* Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. 2012.
7. Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. Vol. 35, *Endocrine Reviews.* Endocrine Society; 2014. p. 851–905.
8. Menkhorst EM, Van Sinderen ML, Rainczuk K, Cuman C, Winship A, Dimitriadis E. Invasive trophoblast promote stromal fibroblast decidualization via Profilin 1 and ALOX5. *Sci Rep.* 2017 Dec 18;7(1):8690.
9. Aplin JD, Meseguer M, Simón C, Ortíz M, Croxatto H, Jones C. MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochem Soc Trans.* 2001 Apr 1;29(2):153.
10. Nikolić I. *Embriologija čoveka: tekst i atlas, 3. Izdanje.* Beograd: Data status; 2007.
11. Simón C, Dominguez F, Remohí J, Pellicer A. Embryo Effects in Human Implantation. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Sep;943(1):1–16.
12. De los Santos MJ, Mercader A, Francés A, Portolés E, Remohí J, Pellicer A, et al. Role of Endometrial Factors in Regulating Secretion of Components of the Immunoreactive Human Embryonic Interleukin-1 System during Embryonic Development. *Biol Reprod.* 1996 Mar 1;54(3):563–74.
13. Simón C, Gimeno MJ, Mercader A, O'Connor JE, Remohí J, Polan ML, et al. Embryonic Regulation of Integrins β_3 , α_4 , and α_1 in Human Endometrial

- Epithelial Cells *in Vitro*. J Clin Endocrinol Metab. 1997 Aug;82(8):2607–16.
14. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, et al. Trophoblast L-Selectin-Mediated Adhesion at the Maternal-Fetal Interface. Science. 2003 Jan 17;299(5605):405–8.
 15. Loke YW, King A. Human Implantation: Cell Biology and Immunology. Cambridge: Cambridge University Press; 1995.
 16. Vićovac L, Aplin JD. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. Acta Anat (Basel). 1996;156(3):202–16.
 17. Vićovac L, Jones CJ, Aplin JD. Trophoblast differentiation during formation of anchoring villi in a model of the early human placenta *in vitro*. Placenta. 1995 Jan;16(1):41–56.
 18. Fisher SJ, Cui TY, Zhang L, Hartman L, Grahl K, Zhang GY, et al. Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells *in vitro*. J Cell Biol. 1989 Aug 1;109(2):891–902.
 19. Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, et al. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. J Cell Biol. 1991 Apr 1;113(2):437–49.
 20. Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, et al. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. Development. 1994 Dec;120(12):3657–66.
 21. Moffett A, Colucci F. Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. J Clin Invest. 2014 May 1;124(5):1872–9.
 22. Moffett A, Chazara O, Colucci F. Maternal allo-recognition of the fetus. Fertil Steril. 2017 Jun;107(6):1269–72.
 23. Weiss G, Sundl M, Glasner A, Huppertz B, Moser G. The trophoblast plug during early pregnancy: a deeper insight. Histochem Cell Biol. 2016 Dec 10;146(6):749–56.
 24. Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. Uterine Glands Provide Histirotrophic Nutrition for the Human Fetus during the First Trimester of Pregnancy. J Clin Endocrinol Metab. 2002 Jun;87(6):2954–9.
 25. Moser G, Gauster M, Orendi K, Glasner A, Theuerkauf R, Huppertz B. Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion? Analysis

- with novel confrontation co-culture models. *Hum Reprod.* 2010 May 1;25(5):1127–36.
26. Moser G, Weiss G, Gauster M, Sundl M, Huppertz B. Evidence from the very beginning: endoglandular trophoblasts penetrate and replace uterine glands in situ and in vitro. *Hum Reprod.* 2015 Dec 1;30(12):2747–57.
 27. Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M. The Uterine Spiral Arteries In Human Pregnancy: Facts and Controversies. *Placenta.* 2006 Sep;27(9–10):939–58.
 28. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, et al. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest.* 1997 May 1;99(9):2139–51.
 29. Moser G, Weiss G, Sundl M, Gauster M, Siwetz M, Lang-Olip I, et al. Extravillous trophoblasts invade more than uterine arteries: evidence for the invasion of uterine veins. *Histochem Cell Biol.* 2017 Mar;147(3):353–66.
 30. Windsperger K, Dekan S, Pils S, Golletz C, Kunihs V, Fiala C, et al. Extravillous trophoblast invasion of venous as well as lymphatic vessels is altered in idiopathic, recurrent, spontaneous abortions. *Hum Reprod.* 2017 Jun 1;32(6):1208–17.
 31. Knöfler M, Haider S, Saleh L, Pollheimer J, Gamage TKJB, James J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cell Mol Life Sci.* 2019 Sep 3;76(18):3479–96.
 32. Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1992 Aug;80(2):283–5.
 33. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of Human Placental Development by Oxygen Tension. *Science.* 1997 Sep 12;277(5332):1669–72.
 34. James JL, Stone PR, Chamley LW. The regulation of trophoblast differentiation by oxygen in the first trimester of pregnancy. *Hum Reprod Update.* 2006 Apr 1;12(2):137–44.
 35. Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of Placental Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Placenta Growth Factor (PlGF) and Soluble Flt-1 by Oxygen— A Review. *Placenta.* 2000 Mar;21:S16–24.

36. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu.* 1972;1:177–91.
37. Ball E, Bulmer J, Ayis S, Lyall F, Robson S. Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion. *J Pathol.* 2006 Mar;208(4):535–42.
38. Lyall F, Robson SC, Bulmer JN. Spiral Artery Remodeling and Trophoblast Invasion in Preeclampsia and Fetal Growth Restriction. *Hypertension.* 2013 Dec;62(6):1046–54.
39. Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL. Evidence for Immune Cell Involvement in Decidual Spiral Arteriole Remodeling in Early Human Pregnancy. *Am J Pathol.* 2009 May;174(5):1959–71.
40. Harris LK, Keogh RJ, Wareing M, Baker PN, Cartwright JE, Aplin JD, et al. Invasive Trophoblasts Stimulate Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis by a Fas Ligand-Dependent Mechanism. *Am J Pathol.* 2006 Nov;169(5):1863–74.
41. Choudhury RH, Dunk CE, Lye SJ, Aplin JD, Harris LK, Jones RL. Extravillous Trophoblast and Endothelial Cell Crosstalk Mediates Leukocyte Infiltration to the Early Remodeling Decidual Spiral Arteriole Wall. *J Immunol.* 2017 May 15;198(10):4115–28.
42. Multhaupt A, Huppertz B, Göhner C, Böhringer M, Mai M, Markert U, et al. N-cadherin knockdown leads to disruption of trophoblastic and endothelial cell interaction in a 3D cell culture model - New insights in trophoblast invasion failure. *Cell Adh Migr.* 2018 May 4;12(3):259–70.
43. Ashton S V, Whitley GSJ, Dash PR, Wareing M, Crocker IP, Baker PN, et al. Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jan;25(1):102–8.
44. Harris LK. Review: Trophoblast-Vascular Cell Interactions in Early Pregnancy: How to Remodel a Vessel. *Placenta.* 2010 Mar;31:S93–8.
45. Murray M, Lessey B. Embryo Implantation and Tumor Metastasis: Common Pathways of Invasion and Angiogenesis. *Semin Reprod Med.* 1999 Sep 15;17(03):275–90.
46. Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell*

- Biol. 1993 Feb 1;120(3):577–85.
47. Lafrenie RM, Yamada KM. Integrin-dependent signal transduction. *J Cell Biochem.* 1996 Jun 15;61(4):543–53.
 48. Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest.* 1992 Jan 1;89(1):210–22.
 49. Aplin JD. Expression of integrin alpha 6 beta 4 in human trophoblast and its loss from extravillous cells. *Placenta.* 1993;14(2):203–15.
 50. Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003;19:207–35.
 51. Babawale MO, Van Noorden S, Pignatelli M, Stamp GW, Elder MG, Sullivan MH. Morphological interactions of human first trimester placental villi co-cultured with decidual explants. *Hum Reprod.* 1996 Feb;11(2):444–50.
 52. Cavallaro U. N-cadherin as an invasion promoter: a novel target for antitumor therapy? *Curr Opin Investig Drugs.* 2004 Dec;5(12):1274–8.
 53. Islam S, Carey TE, Wolf GT, Wheelock MJ, Johnson KR. Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 1996 Dec 1;135(6):1643–54.
 54. Hazan RB, Kang L, Whooley BP, Borgen PI. N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes Commun.* 1997 Mar;4(6):399–411.
 55. Zhao H-J, Klausen C, Li Y, Zhu H, Wang Y-L, Leung PCK. Bone morphogenetic protein 2 promotes human trophoblast cell invasion by upregulating N-cadherin via non-canonical SMAD2/3 signaling. *Cell Death Dis.* 2018 Feb 7;9(2):174.
 56. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol.* 2000 Feb 21;148(4):779–90.
 57. Bulla R, Villa A, Bossi F, Cassetti A, Radillo O, Spessotto P, et al. VE-cadherin is a critical molecule for trophoblast?endothelial cell interaction in decidual spiral

- arteries. *Exp Cell Res.* 2004 Oct 1;303(1):101–13.
58. Thirkill TL, Douglas GC. The vitronectin receptor plays a role in the adhesion of human cytotrophoblast cells to endothelial cells. *Endothelium.* 1999;6(4):277–90.
59. Lala PK, Graham CH. Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and protease inhibitors. *Cancer Metastasis Rev.* 1990 Dec;9(4):369–79.
60. Librach CL, Feigenbaum SL, Bass KE, Cui TY, Verastas N, Sadovsky Y, et al. Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. *J Biol Chem.* 1994 Jun 24;269(25):17125–31.
61. Deb K, Chaturvedi MM, Jaiswal YK. Comprehending the role of LPS in Gram-negative bacterial vaginosis: ogling into the causes of unfulfilled child-wish. *Arch Gynecol Obstet.* 2004 Nov 18;270(3):133–46.
62. Minassian C, Thomas SL, Williams DJ, Campbell O, Smeeth L. Acute maternal infection and risk of pre-eclampsia: a population-based case-control study. Dewan A, editor. *PLoS One.* 2013 Sep 3;8(9):e73047.
63. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine Infection and Preterm Delivery. Epstein FH, editor. *N Engl J Med.* 2000 May 18;342(20):1500–7.
64. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Mar;1221(1):80–7.
65. Bauer S, Pollheimer J, Hartmann J, Husslein P, Aplin JD, Knöfler M. Tumor Necrosis Factor- α Inhibits Trophoblast Migration through Elevation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in First-Trimester Villous Explant Cultures. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Feb;89(2):812–22.
66. Lash GE, Otun HA, Innes BA, Kirkley M, De Oliveira L, Searle RF, et al. Interferon- γ inhibits extravillous trophoblast cell invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels. *FASEB J.* 2006 Dec;20(14):2512–8.
67. Jovanović M, Vićovac L. Interleukin-6 Stimulates Cell Migration, Invasion and Integrin Expression in HTR-8/SVneo Cell Line. *Placenta.* 2009 Apr;30(4):320–8.
68. Jovanović M, Stefanoska I, Radojčić L, Vićovac L. Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix

- metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins $\alpha 5$ and $\beta 1$. *Reproduction*. 2010 Apr;139(4):789–98.
69. Jovanović Krivokuća M, Stefanoska I, Abu Rabi T, Al-Abed Y, Stošić-Grujičić S, Vićovac L. Pharmacological inhibition of MIF interferes with trophoblast cell migration and invasiveness. *Placenta*. 2015 Feb;36(2):150–9.
 70. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med*. 2006 Sep 6;12(9):1065–74.
 71. Abrahams VM, Bole-Aldo P, Kim YM, Straszewski-Chavez SL, Chaiworapongsa T, Romero R, et al. Divergent Trophoblast Responses to Bacterial Products Mediated by TLRs. *J Immunol*. 2004 Oct 1;173(7):4286–96.
 72. Lurain JR. Gestational trophoblastic disease I: epidemiology, pathology, clinical presentation and diagnosis of gestational trophoblastic disease, and management of hydatidiform mole. *Am J Obstet Gynecol*. 2010 Dec;203(6):531–9.
 73. Seckl MJ, Sebire NJ, Berkowitz RS. Gestational trophoblastic disease. *Lancet*. 2010 Aug 28;376(9742):717–29.
 74. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*. 1966 Jul 1;153(3731):80–2.
 75. David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1966 Jul;56(1):72–7.
 76. Stosic-Grujicic S, Stojanovic I, Nicoletti F. MIF in autoimmunity and novel therapeutic approaches. *Autoimmun Rev*. 2009 Jan;8(3):244–9.
 77. Nobre CCG, de Araújo JMG, Fernandes TAA de M, Cobucci RNO, Lanza DCF, Andrade VS, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Biological Activities and Relation with Cancer. *Pathol Oncol Res*. 2017 Apr 23;23(2):235–44.
 78. Tilstam P V, Qi D, Leng L, Young L, Bucala R. MIF family cytokines in cardiovascular diseases and prospects for precision-based therapeutics. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21(7):671–83.
 79. Budarf M, McDonald T, Sellinger B, Kozak C, Graham C, Wistow G. Localization of the human gene for macrophage migration inhibitory factor

- (MIF) to chromosome 22q11.2. *Genomics*. 1997 Jan 15;39(2):235–6.
80. Paralkar V, Wistow G. Cloning the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Genomics*. 1994 Jan 1;19(1):48–51.
81. Sparkes A, De Baetselier P, Roelants K, De Trez C, Magez S, Van Ginderachter JA, et al. The non-mammalian MIF superfamily. *Immunobiology*. 2017;222(3):473–82.
82. Weiser WY, Temple PA, Witek-Giannotti JS, Remold HG, Clark SC, David JR. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci*. 1989 Oct;86(19):7522–6.
83. Sun HW, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci*. 1996 May 28;93(11):5191–6.
84. Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003 Oct 1;3(10):791–800.
85. Rosengren E, Bucala R, Åman P, Jacobsson L, Odh G, Metz CN, et al. The Immunoregulatory Mediator Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Catalyzes a Tautomerization Reaction. *Mol Med*. 1996 Jan;2(1):143–9.
86. Lubetsky JB, Swope M, Dealwis C, Blake P, Lolis E. Pro-1 of macrophage migration inhibitory factor functions as a catalytic base in the phenylpyruvate tautomerase activity. *Biochemistry*. 1999 Jun 1;38(22):7346–54.
87. Lubetsky JB, Dios A, Han J, Aljabari B, Ruzsicska B, Mitchell R, et al. The Tautomerase Active Site of Macrophage Migration Inhibitory Factor Is a Potential Target for Discovery of Novel Anti-inflammatory Agents. *J Biol Chem*. 2002 Jul 12;277(28):24976–82.
88. Al-Abed Y, Dabideen D, Aljabari B, Valster A, Messmer D, Ochani M, et al. ISO-1 Binding to the Tautomerase Active Site of MIF Inhibits Its Pro-inflammatory Activity and Increases Survival in Severe Sepsis. *J Biol Chem*. 2005 Nov 4;280(44):36541–4.
89. Al-Abed Y, VanPatten S. MIF as a disease target: ISO-1 as a proof-of-concept therapeutic. *Future Med Chem*. 2011 Jan;3(1):45–63.
90. Kleemann R, Kapurniotu A, Frank RW, Gessner A, Mischke R, Flieger O, et al. Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor

- (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. *J Mol Biol.* 1998 Jul 3;280(1):85–102.
91. Wang Y, An R, Umanah GK, Park H, Nambiar K, Eacker SM, et al. A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Science.* 2016;354(6308).
 92. Arcuri F, Cintonino M, Vatti R, Carducci A, Liberatori S, Paulesu L. Expression of macrophage migration inhibitory factor transcript and protein by first-trimester human trophoblasts. *Biol Reprod.* 1999 Jun;60(6):1299–303.
 93. Maaser C, Eckmann L, Paesold G, Kim HS, Kagnoff MF. Ubiquitous production of macrophage migration inhibitory factor by human gastric and intestinal epithelium. *Gastroenterology.* 2002 Mar;122(3):667–80.
 94. Nishihira J, Koyama Y, Mizue Y. Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human vascular endothelial cells and its induction by lipopolysaccharide. *Cytokine.* 1998 Mar;10(3):199–205.
 95. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med.* 1994 Jun 1;179(6):1895–902.
 96. Daryadel A, Grifone RF, Simon H-U, Yousefi S. Apoptotic Neutrophils Release Macrophage Migration Inhibitory Factor upon Stimulation with Tumor Necrosis Factor- α . *J Biol Chem.* 2006 Sep 15;281(37):27653–61.
 97. Roth S, Agthe M, Eickhoff S, Möller S, Karsten CM, Borregaard N, et al. Secondary necrotic neutrophils release interleukin-16C and macrophage migration inhibitory factor from stores in the cytosol. *Cell Death Discov.* 2015 Dec 30;1(1):15056.
 98. Nishino T, Bernhagen J, Shiiki H, Calandra T, Dohi K, Bucala R. Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol Med.* 1995 Nov;1(7):781–8.
 99. Wada S, Fujimoto S, Mizue Y, Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor in the human ovary: presence in the follicular fluids and production by granulosa cells. *Biochem Mol Biol Int.* 1997 Apr;41(4):805–14.
 100. Arcuri F, Ricci C, Ietta F, Cintonino M, Tripodi SA, Cetin I, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Human Endometrium: Expression and

- Localization During the Menstrual Cycle and Early Pregnancy. *Biol Reprod.* 2001;64:1200–5.
101. Djudjaj S, Martin I V, Buhl EM, Nothofer NJ, Leng L, Piecychna M, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Limits Renal Inflammation and Fibrosis by Counteracting Tubular Cell Cycle Arrest. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Dec;28(12):3590–604.
 102. Marin V, Poulsen K, Odena G, McMullen MR, Altamirano J, Sancho-Bru P, et al. Hepatocyte-derived macrophage migration inhibitory factor mediates alcohol-induced liver injury in mice and patients. *J Hepatol.* 2017;67(5):1018–25.
 103. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature.* 1993 Oct 21;365(6448):756-9.
 104. Kamimura A, Kamachi M, Nishihira J, Ogura S, Isobe H, Dosaka-Akita H, et al. Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer.* 2000 Jul 15;89(2):334–41.
 105. Cao WG, Morin M, Sengers V, Metz C, Roger T, Maheux R, et al. Tumour necrosis factor-alpha up-regulates macrophage migration inhibitory factor expression in endometrial stromal cells via the nuclear transcription factor NF-kappaB. *Hum Reprod.* 2006 Feb;21(2):421–8.
 106. Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature.* 1995 Sep 7;377(6544):68–71.
 107. Vedder H, Krieg JC, Gerlach B, Gemsa D, Bacher M. Expression and glucocorticoid regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in hippocampal and neocortical rat brain cells in culture. *Brain Res.* 2000 Jun 30;869(1–2):25–30.
 108. Ietta F, Wu Y, Romagnoli R, Soleymanlou N, Orsini B, Zamudio S, et al. Oxygen regulation of macrophage migration inhibitory factor in human placenta. *Am J Physiol Metab.* 2007 Jan;292(1):E272–80.
 109. Bernhagen J, Mitchell RA, Calandra T, Voelter W, Cerami A, Bucala R. Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human

- macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry*. 1994 Nov 29;33(47):14144–55.
110. Flieger O, Engling A, Bucala R, Lue H, Nickel W, Bernhagen J. Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS Lett*. 2003 Sep 11;551(1–3):78–86.
 111. Merk M, Baugh J, Zierow S, Leng L, Pal U, Lee SJ, et al. The Golgi-Associated Protein p115 Mediates the Secretion of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *J Immunol*. 2009 Jun 1;182(11):6896-906.
 112. Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med*. 2003 Jun 2;197(11):1467–76.
 113. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med*. 2007 May;13(5):587–96.
 114. Alampour-Rajabi S, El Bounkari O, Rot A, Muller-Newen G, Bachelerie F, Gawaz M, et al. MIF interacts with CXCR7 to promote receptor internalization, ERK1/2 and ZAP-70 signaling, and lymphocyte chemotaxis. *FASEB J*. 2015 Nov 1;29(11):4497–511.
 115. Borghese F, Clanchy FIL. CD74: an emerging opportunity as a therapeutic target in cancer and autoimmune disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2011 Mar;15(3):237–51.
 116. Jankauskas SS, Wong DWL, Bucala R, Djudjaj S, Boor P. Evolving complexity of MIF signaling. *Cell Signal*. 2019 May;57:76–88.
 117. Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li J, et al. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity*. 2006 Oct;25(4):595–606.
 118. Gore Y, Starlets D, Maharshak N, Becker-Herman S, Kaneyuki U, Leng L, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74-CD44 receptor complex. *J Biol Chem*. 2008 Feb 1;283(5):2784–92.
 119. Amin MA, Haas CS, Zhu K, Mansfield PJ, Kim MJ, Lackowski NP, et al. Migration inhibitory factor up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 and

- intercellular adhesion molecule-1 via Src, PI3 kinase, and NFkappaB. *Blood*. 2006 Mar 15;107(6):2252–61.
120. Becker-Herman S, Arie G, Medvedovsky H, Kerem A, Shachar I. CD74 is a member of the regulated intramembrane proteolysis-processed protein family. *Mol Biol Cell*. 2005 Nov;16(11):5061–9.
 121. Starlets D, Gore Y, Binsky I, Haran M, Harpaz N, Shvidel L, et al. Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood*. 2006 Jun 15;107(12):4807–16.
 122. Weber C, Kraemer S, Drechsler M, Lue H, Koenen RR, Kapurniotu A, et al. Structural determinants of MIF functions in CXCR2-mediated inflammatory and atherogenic leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 21;105(42):16278–83.
 123. Kraemer S, Lue H, Zerneck A, Kapurniotu A, Andreetto E, Frank R, et al. MIF-chemokine receptor interactions in atherogenesis are dependent on an N-loop-based 2-site binding mechanism. *FASEB J*. 2011 Mar;25(3):894–906.
 124. Lacy M, Kontos C, Brandhofer M, Hille K, Gröning S, Sinitski D, et al. Identification of an Arg-Leu-Arg tripeptide that contributes to the binding interface between the cytokine MIF and the chemokine receptor CXCR4. *Sci Rep*. 2018 Mar 26;8(1):5171.
 125. Schwartz V, Lue H, Kraemer S, Korbiel J, Krohn R, Ohl K, et al. A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett*. 2009 Sep 3;583(17):2749–57.
 126. Onodera S, Nishihira J, Koyama Y, Majima T, Aoki Y, Ichiyama H, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Up-Regulates the Expression of Interleukin-8 Messenger RNA in Synovial Fibroblasts of Rheumatoid Arthritis Patients: Common Transcriptional Regulatory Mechanism between Interleukin-8 and Interleukin-1 β . *Arthritis Rheum*. 2004 May;50(5):1437–47.
 127. Wang F, Wu H, Xu S, Guo X, Yang J, Shen X. Macrophage migration inhibitory factor activates cyclooxygenase 2-prostaglandin E2 in cultured spinal microglia. *Neurosci Res*. 2011 Nov;71(3):210–8.
 128. Petrovsky N, Socha L, Silva D, Grossman AB, Metz C, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor exhibits a pronounced circadian rhythm relevant to its

- role as a glucocorticoid counter-regulator. *Immunol Cell Biol.* 2003 Apr;81(2):137–43.
129. Cherepkova OA, Lyutova EM, Eronina TB, Gurvits BY. Chaperone-like activity of macrophage migration inhibitory factor. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006 Jan;38(1):43–55.
130. Israelson A, Ditsworth D, Sun S, Song SW, Liang J, Hruska-Plochan M, et al. Macrophage migration inhibitory factor as a chaperone inhibiting accumulation of misfolded SOD1. *Neuron.* 2015 Apr 8;86(1):218–32.
131. Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem.* 1999 Jun 18;274(25):18100–6.
132. Amin MA, Volpert O V, Woods JM, Kumar P, Harlow LA, Koch AE. Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase. *Circ Res.* 2003 Aug 22;93(4):321–9.
133. Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 8;99(1):345–50. 1
134. Fraga Costa A, Zago Gomes S, Lorenzon-Ojea AR, Martucci M, Rubio Faria M, ecio dos Santos Pinto Jr D, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces phosphorylation of Mdm2 mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase: Role of this pathway in decidual cell survival. 2016 May;41:27–38.
135. Veillat V, Carli C, Metz CN, Al-Abed Y, Naccache PH, Akoum A. Macrophage Migration Inhibitory Factor Elicits an Angiogenic Phenotype in Human Ectopic Endometrial Cells and Triggers the Production of Major Angiogenic Factors via CD44, CD74, and MAPK Signaling Pathways. *Mol Endocrinol.* 2010 Oct;24(10):2070–1.
136. Cheng Q, McKeown SJ, Santos L, Santiago FS, Khachigian LM, Morand EF, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Increases Leukocyte-Endothelial Interactions in Human Endothelial Cells via Promotion of Expression of Adhesion Molecules. *J Immunol.* 2010 Jul 15;185(2):1238–47.

137. Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hültner L, et al. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med*. 2000 Feb;6(2):164–70.
138. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, [Cell](#). 2011 Mar 4;144(5):646-74.
139. Zhao YM, Wang L, Dai Z, Wang DD, Hei ZY, Zhang N, et al. Validity of plasma macrophage migration inhibitory factor for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2011 Nov 15;129(10):2463–72.
140. DE Souza MB, Curioni OA, Kanda JL, DE Carvalho MB. Serum and salivary macrophage migration inhibitory factor in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2014 Nov;8(5):2267–75.
141. Li Y, Lu C, Xing G, Zhu Y, He F. Macrophage migration inhibitory factor directly interacts with hepatopoietin and regulates the proliferation of hepatoma cell. *Exp Cell Res*. 2004 Nov 1;300(2):379–87.
142. Fukaya R, Ohta S, Yaguchi T, Matsuzaki Y, Sugihara E, Okano H, et al. MIF Maintains the Tumorigenic Capacity of Brain Tumor-Initiating Cells by Directly Inhibiting p53. *Cancer Res*. 2016;76(9):2813–23.
143. Simpson KD, Templeton DJ, Cross J V. Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor growth and metastasis by inducing myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Immunol*. 2012 Dec 15;189(12):5533–40.
144. Chesney J, Metz C, Bacher M, Peng T, Meinhardt A, Bucala R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med*. 1999 Mar;5(3):181–91.
145. Ogawa H, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Takahashi N, Oshima T, et al. An antibody for macrophage migration inhibitory factor suppresses tumour growth and inhibits tumour-associated angiogenesis. *Cytokine*. 2000 Apr;12(4):309–14.
146. Ren Y, Tsui H-T, Poon RT-P, Ng IO-L, Li Z, Chen Y, et al. Macrophage migration inhibitory factor: roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma. *Int J cancer*. 2003 Oct 20;107(1):22–9.
147. Chesney J, Mitchell R. 25 Years On: A Retrospective on Migration Inhibitory Factor in Tumor Angiogenesis. *Mol Med*. 2015 Oct 27;21(Suppl 1):1.

148. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992 Oct 29;359(6398):843–5.
149. Fu H, Luo F, Yang L, Wu W, Liu X. Hypoxia stimulates the expression of macrophage migration inhibitory factor in human vascular smooth muscle cells via HIF-1 α dependent pathway. *BMC Cell Biol*. 2010 Aug 20;11(1):66.
150. Oda S, Oda T, Nishi K, Takabuchi S, Wakamatsu T, Tanaka T, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Activates Hypoxia-Inducible Factor in a p53-Dependent Manner. Abraham E, editor. *PLoS One*. 2008 May 21;3(5):e2215.
151. Sun B, Nishihira J, Yoshiki T, Kondo M, Sato Y, Sasaki F, et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor invasion and metastasis via the Rho-dependent pathway. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 1;11(3):1050–8.
152. Rendon BE, Roger T, Teneng I, Zhao M, Al-Abed Y, Calandra T, et al. Regulation of Human Lung Adenocarcinoma Cell Migration and Invasion by Macrophage Migration Inhibitory Factor. *J Biol Chem*. 2007 Oct 12;282(41):29910–8.
153. Subbannayya T, Leal-Rojas P, Barbhuiya MA, Raja R, Renuse S, Sathe G, et al. Macrophage migration inhibitory factor - a therapeutic target in gallbladder cancer. *BMC Cancer*. 2015 Dec 4;15(1):843.
154. ZENG J, QUAN J, XIA X. Transient transfection of macrophage migration inhibitory factor small interfering RNA disrupts the biological behavior of oral squamous carcinoma cells. *Mol Med Rep*. 2016 Jan;13(1):174–80.
155. Md Fuzi AA, Omar SZ, Mohamed Z, Mat Adenan NA, Mokhtar NM. High throughput silencing identifies novel genes in endometrioid endometrial cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2018 Apr;57(2):217–26.
156. Oloumi A, McPhee T, Dedhar S. Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Apr 1;1691(1):1–15.
157. Funamizu N, Hu C, Lacy C, Schetter A, Zhang G, He P, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces epithelial to mesenchymal transition, enhances tumor aggressiveness and predicts clinical outcome in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J cancer*. 2013 Feb 15;132(4):785–94.

158. Liu H, Chen G, Zhang W, Zhu J-Y, Lin Z-Q, Gong Z-C, et al. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor in adenoid cystic carcinoma: correlation with enhanced metastatic potential. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013 Feb 12;139(2):287–95.
159. Ietta F, Bechi N, Romagnoli R, Bhattacharjee J, Realacci M, Di Vito M, et al. 17 β -Estradiol modulates the macrophage migration inhibitory factor secretory pathway by regulating ABCA1 expression in human first-trimester placenta. *Am J Physiol Metab.* 2010 Mar;298(3):E411–8.
160. Hristoskova S, Holzgreve W, Zhong XY, Hahn S. Macrophage migration inhibition factor is elevated in pregnancy, but not to a greater extent in preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2006 Apr 21;274(1):25–8.
161. Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Saito H, Watari M, et al. Decreased serum levels of macrophage migration inhibition factor in miscarriages with normal chromosome karyotype. *Hum Reprod.* 2003 Mar;18(3):616–20.
162. Todros T, Bontempo S, Piccoli E, Ietta F, Romagnoli R, Biolcati M, et al. Increased levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005 Dec 1;123(2):162–6.
163. Ietta F, Todros T, Ticconi C, Piccoli E, Zicari A, Piccione E, et al. Macrophage migration inhibitory factor in human pregnancy and labor. *Am J Reprod Immunol.* 2002 Dec;48(6):404–9.
164. Ietta F, Ferro EAV, Bevilacqua E, Benincasa L, Maioli E, Paulesu L. Role of the Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in the survival of first trimester human placenta under induced stress conditions. *Sci Rep.* 2018 Dec 14;8(1):12150.
165. Arcuri F, Cintonino M, Carducci A, Papa S, Riparbelli MG, Mangioni S, et al. Human decidual natural killer cells as a source and target of macrophage migration inhibitory factor. *Reproduction.* 2006 Jan;131(1):175–82.
166. Ferro EAV, Mineo JR, Ietta F, Bechi N, Romagnoli R, Silva DAO, et al. Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. *Am J Pathol.* 2008

- Jan;172(1):50–8.
167. de Oliveira Gomes A, de Oliveira Silva DA, Silva NM, de Freitas Barbosa B, Franco PS, Angeloni MB, et al. Effect of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Human Placental Explants Infected with *Toxoplasma gondii* Depends on Gestational Age. *Am J Pathol*. 2011 Jun;178(6):2792–801.
 168. Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, et al. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res*. 1993 Jun;206(2):204–11.
 169. Jiménez N, Krouwer VJD, Post JA. A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro. *Cytotechnology*. 2013 Jan;65(1):1–14.
 170. Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(8):2496.
 171. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1–2):55–63.
 172. Beltrame JS, Sordelli MS, Cañumil VA, Franchi AM, Ribeiro ML. Lysophosphatidic acid-triggered pathways promote the acquisition of trophoblast endovascular phenotype in vitro. *J Cell Biochem*. 2018 Jan;119(1):758–72.
 173. Bainbridge SA, Roberts JM, von Versen-Höynck F, Koch J, Edmunds L, Hubel CA. Uric acid attenuates trophoblast invasion and integration into endothelial cell monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009 Aug;297(2):C440-50.
 174. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
 175. Ng YH, Zhu H, Leung PCK. Twist Modulates Human Trophoblastic Cell Invasion via Regulation of N-Cadherin. *Endocrinology*. 2012 Feb 1;153(2):925–36.
 176. Svinarich DM, Bitonti OM, Romero R, Gonik B. Induction and posttranslational expression of cytokines in a first-trimester trophoblast cell line by lipopolysaccharide. *Am J Obstet Gynecol*. 1996 Oct;175(4 Pt 1):970–3.
 177. Pattillo RA, Hussa RO, Huang WY, Delfs E, Mattingly RF. Estrogen production

- by trophoblastic tumors in tissue culture. *J Clin Endocrinol.* 1972 Jan;34:59–61.
178. Jovanović M, Vićovac L. Interleukin-6 Stimulates Cell Migration, Invasion and Integrin Expression in HTR-8/SVneo Cell Line. *Placenta.* 2009 Apr;30(4):320–8.
179. Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta.* 1980;1(1):3–19.
180. Highet AR, Zhang VJ, Heinemann GK, Roberts CT. Use of Matrigel in culture affects cell phenotype and gene expression in the first trimester trophoblast cell line HTR8/SVneo. *Placenta.* 2012 Jul;33(7):586–8. A
181. Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Benton G. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis.* 2009 Sep 28;12(3):267–74.
182. Shan Z-X, Lin Q-X, Yang M, Zhang B, Zhu J-N, Mai L-P, et al. Transcription factor Ap-1 mediates proangiogenic MIF expression in human endothelial cells exposed to Angiotensin II. *Cytokine.* 2011 Jan 1;53(1):35–41.
183. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia Is Associated with Failure of Human Cytotrophoblasts to Mimic a Vascular Adhesion Phenotype One Cause of Defective Endovascular Invasion in This Syndrome? Vol. 99, *J. Clin. Invest.* 1997 May 1;99(9):2152-64.
184. Chen Q, Stone PR, McCowan LME, Chamley LW. Interaction of Jar choriocarcinoma cells with endothelial cell monolayers. *Placenta.* 2005 Sep;26(8–9):617–25.
185. James JL, Cartwright JE, Whitley GS, Greenhill DR, Hoppe A. The regulation of trophoblast migration across endothelial cells by low shear stress: consequences for vascular remodelling in pregnancy. *Cardiovasc Res.* 2012 Jan 1;93(1):152–61.
186. James JL, Whitley GS, Cartwright JE. Shear stress and spiral artery remodelling: the effects of low shear stress on trophoblast-induced endothelial cell apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2011 Apr 1;90(1):130–9.
187. Burrows TD, King A, Loke YW. Expression of adhesion molecules by endovascular trophoblast and decidual endothelial cells: implications for vascular invasion during implantation. *Placenta.* 1994 Jan;15(1):21–33.
188. Fernandez-Borja M, van Buul JD, Hordijk PL. The regulation of leucocyte

- transendothelial migration by endothelial signalling events. *Cardiovasc Res*. 2010 May 1;86(2):202–10.
189. Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR, Sandstedt B, Bremme K, Ekström ES, et al. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. *Immunology*. 2002 Sep;107(1):145–51.
190. Ma Y, Krikun G, Abrahams VM, Mor G, Guller S. Cell Type-specific Expression and Function of Toll-like Receptors 2 and 4 in Human Placenta: Implications in Fetal Infection. *Placenta*. 2007 Oct;28(10):1024–31.
191. Anton L, Brown AG, Parry S, Elovitz MA. Lipopolysaccharide induces cytokine production and decreases extravillous trophoblast invasion through a mitogen-activated protein kinase-mediated pathway: possible mechanisms of first trimester placental dysfunction. *Hum Reprod*. 2012 Jan;27(1):61–72.
192. Li L, Tu J, Jiang Y, Zhou J, Yabe S, Schust DJ. Effects of Lipopolysaccharide on Human First Trimester Villous Cytotrophoblast Cell Function In Vitro. *Biol Reprod*. 2016 Feb;94(2):33.
193. Calandra T, Echtenacher B, Roy D Le, Pugin J, Metz CN, Hültner L, et al. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med*. 2000 Feb 1;6(2):164–70.
194. Emonts M, Sweep FCGJ, Grebenchtchikov N, Geurts-Moespot A, Knaup M, Chanson AL, et al. Association between High Levels of Blood Macrophage Migration Inhibitory Factor, Inappropriate Adrenal Response, and Early Death in Patients with Severe Sepsis. *Clin Infect Dis*. 2007 May 15;44(10):1321–8.
195. Chuang T-Y, Chang H-T, Chung K-P, Cheng H-S, Liu C-Y, Liu Y-C, et al. High levels of serum macrophage migration inhibitory factor and interleukin 10 are associated with a rapidly fatal outcome in patients with severe sepsis. *Int J Infect Dis*. 2014 Mar 1;20:13–7.
196. Meyer-Siegler KL, Iczkowski KA, Leng L, Bucala R, Vera PL. Inhibition of Macrophage Migration Inhibitory Factor or Its Receptor (CD74) Attenuates Growth and Invasion of DU-145 Prostate Cancer Cells. *J Immunol*. 2006 Dec 15;177(12):8730–9.
197. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Iwashige H, Aridome K, et al.

- Invariant chain expression in gastric cancer. *Cancer Lett.* 2001 Jul 10;168(1):87–91.
198. Liu Z, Chu S, Yao S, Li Y, Fan S, Sun X, et al. CD74 interacts with CD44 and enhances tumorigenesis and metastasis via RHOA-mediated cofilin phosphorylation in human breast cancer cells. *Oncotarget.* 2016 Oct 18;7(42):68303–13.
199. Presti M, Mazzon E, Basile M, Petralia M, Bramanti A, Colletti G, et al. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor and functionally-related genes, D-DT, CD74, CD44, CXCR2 and CXCR4, in glioblastoma. *Oncol Lett.* 2018 Jun 19;16(3):2881–6.
200. Tian B, Zhang Y, Li N, Liu X, Dong J. CD74: a potential novel target for triple-negative breast cancer. *Tumor Biol.* 2012 Dec 31;33(6):2273–7.
201. Figueiredo CR, Azevedo RA, Mousdell S, Resende-Lara PT, Ireland L, Santos A, et al. Blockade of MIF–CD74 Signalling on Macrophages and Dendritic Cells Restores the Antitumour Immune Response Against Metastatic Melanoma. *Front Immunol.* 2018 May 23;9:1132.
202. Han L, Jiang B, Wu H, Wang X, Tang X, Huang J, et al. High expression of CXCR2 is associated with tumorigenesis, progression, and prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. *Med Oncol.* 2012 Dec 25;29(4):2466–72.
203. Qiao B, Luo W, Liu Y, Wang J, Liu C, Liu Z, et al. The prognostic value of CXC chemokine receptor 2 (CXCR2) in cancers: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2018 Mar 13;9(19):15068–76.
204. Bahn RS, Worsham A, Speeg K V, Ascoli M, Rabin D. Characterization of steroid production in cultured human choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981 Mar;52(3):447–50.
205. Drwal E, Rak A, Gregoraszczyk E. Co-culture of JEG-3, BeWo and syncBeWo cell lines with adrenal H295R cell line: an alternative model for examining endocrine and metabolic properties of the fetoplacental unit. *Cytotechnology.* 2018 Feb;70(1):285–97.
206. Vera PL, Meyer-Siegler KL. Substance P induces localization of MIF/ α 1-inhibitor-3 complexes to umbrella cells via paracellular transit through the urothelium in the rat bladder. *BMC Urol.* 2006 Dec 18;6(1):24.

207. Vera PL, Icykowski KA, Leng L, Bucala R, Meyer-Siegler KL. Macrophage Migration Inhibitory Factor is released as a complex with α 1-inhibitor-3 in the intraluminal fluid during bladder inflammation in the rat. *J Urol*. 2005 Jul;174(1):338–43.
208. Meyer-Siegler KL, Iczkowski KA, Vera PL. Further evidence for increased macrophage migration inhibitory factor expression in prostate cancer. *BMC Cancer*. 2005 Dec 6;5(1):73.
209. No YR, Lee S-J, Kumar A, Yun CC. HIF1 α -Induced by Lysophosphatidic Acid Is Stabilized via Interaction with MIF and CSN5. Templeton DJ, editor. *PLoS One*. 2015 Sep 9;10(9):e0137513.
210. Jung H, Seong H-A, Ha H. Critical Role of Cysteine Residue 81 of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in MIF-induced Inhibition of p53 Activity. *J Biol Chem*. 2008 Jul 18;283(29):20383–96.
211. Burger-Kentischer A, Finkelmeier D, Thiele M, Schmucker J, Geiger G, Tovar GEM, et al. Binding of JAB1/CSN5 to MIF is mediated by the MPN domain but is independent of the JAMM motif. *FEBS Lett*. 2005 Mar 14;579(7):1693–701.
212. Huining L, Jingting C, Keren H. Metastasis gene expression analyses of choriocarcinoma and the effect of silencing metastasis-associated genes on metastatic ability of choriocarcinoma cells. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2011;32(3):264–8.

Biografija

Aleksandra A. Vilotić je rođena 05.12.1983. u Beogradu. Diplomirala je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2011. godine u okviru studijske grupe Biologija sa prosečnom ocenom 9.29. Diplomski rad pod nazivom „Ekspresija NADPH oksidaze u mozgu pacova u dva animalna modela shizofrenije“ uradila je u Laboratoriji za neurohemiju na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2015. godine, u okviru studijskog programa Biologija, modul Biologija ćelija i tkiva. Od aprila 2015. godine zaposlena je na Institutu za primenu nuklearne energije, INEP, Univerziteta u Beogradu, na Odeljenju za biologiju reprodukcije gde je i uradila eksperimentalni deo svoje doktorske disertacije. Angažovana je na projektu „Trofoblast i ekstraembrionalne fetalne ćelije: plastičnost, faktori diferencijacije i *in vitro* modulacija funkcionalnih svojstava“ (MPNTR RS, projekat 173004).

Član je Srpskog biološkog društva i Srpskog biohemijskog društva od 2018. godine. Do sada je objavila deset radova u međunarodnim časopisima. Imala je jedanaest saopštenja na naučnim skupovima domaćeg i međunarodnog značaja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана **Александра Вилотић**

број индекса **Б3048/2015**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Значај фактора инхибиције миграције макрофага за функцију трофобласта човека

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

Потпис докторанда

У Београду, 03.10.2019.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Александра Вилотић**
Број индекса **Б3048/2015**
Студијски програм **Биологија, модул: Биологија ћелија и ткива**
Наслов рада **Значај фактора инхибиције миграције макрофага за функцију
трофобласта човека**
Ментори **др Милица Јовановић Кривокућа, научни сарадник**
 др Маја Чакић-Милошевић, доцент

Потписана **Александра Вилотић**

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 03.10.2019.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Значај фактора инхибиције миграције макрофага за функцију трофобласта човека

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 03.10.2019.

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.