

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Lea Kottek**

**EKSPRESIJA PROTEINA SIGNALNOG**

**PUTA HEDGEHOG U HUMANIM**

**POSTELJICAMA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2018.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Lea Kottek**

**EKSPRESIJA PROTEINA SIGNALNOG**

**PUTA HEDGEHOG U HUMANIM**

**POSTELJICAMA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2018.**

Rad je izvođen na Medicinskom fakultetu Osijek, Katedri za Medicinsku biologiju i genetiku. Eksperimentalni dio rada proveden je u suradnji s Katedrom za Medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Mentor rada: prof. dr. sc. Svjetlana Marić

Rad ima: 34 lista, 3 tablice i 4 slike.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj podršci tijekom studiranja.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Svjetlani Marić na podršci, strpljenju i stručnom vodstvu pri izradi ovoga rada.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Posteljica.....	1
1.1.1. Patologija posteljice.....	2
1.2. Signalni putevi.....	3
1.2.1. Signalni putevi tijekom razvoja.....	4
1.3. Utjecaj signalnih puteva na posteljicu.....	6
2. HIPOTEZA.....	7
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	8
4. MATERIJAL I METODE.....	9
4.1. Ustroj studije.....	9
4.2. Ispitanici.....	9
4.3. Metode.....	10
4.3.1. Imunohistokemija.....	10
4.3.2. Stereologija.....	11
4.4. Statističke metode.....	11
5. REZULTATI.....	12
5.1. Ekspresija PTCH1 proteina.....	12
5.1.1. Usporedba ekspresije PTCH1 u posteljicama s IUGR-om i u kontrolnoj skupini terminskih posteljica.....	13
5.2. Ekspresija GLI3 proteina.....	14
5.2.1. Usporedba ekspresije GLI3 u posteljicama s IUGR-om i u kontrolnoj skupini terminskih posteljica.....	15
5.3. Usporedba ekspresije PTCH1 i GLI3 u posteljicama s IUGR-om i u kontrolnoj skupini terminskih posteljica.....	16
6. RASPRAVA.....	19
7. ZAKLJUČAK.....	21
8. SAŽETAK.....	22
8.1. Cilj istraživanja.....	22
8.2. Nacrt studije.....	22
8.3. Ispitanici i metode.....	22
8.4. Rezultati.....	22
8.5. Zaključak.....	22
9. SUMMARY.....	23
9.1. Objectives.....	23

9.2. Study design .....	23
9.3. Participants and methods .....	23
9.4. Results .....	23
9.5. Conclusion.....	23
10. LITERATURA .....	24
11. ŽIVOTOPIS .....	26

## **POPIS KRATICA**

IUGR- engl. Intrauterine growth restriction

TGF $\beta$ - engl. Transforming growth factor beta

HH- engl. Hedgehog

SHH- engl. Sonic hedgehog

DHH- engl. Desert hedgehog

IHH- engl. Indian hedgehog

Ci- engl. Cubitus interruptus

PTCH- engl. Patched protein

SMO- engl. Smoothened protein

GLI3FL- engl. Gli3 full- lenght

GLI3A- engl. Gli3 activator

GLI3R- engl. Gli3 repressor

EMT- engl. Epithelial- mesenchymal transition

CTB- engl. Villous cytotrophoblast

EVT- engl. Invasive extravillous cytotrophoblast

DAB- engl. 3,3'-Diaminobenzidine

TBS- engl. Tris-buffered saline

DNA- Deoksiribonukleinska kiselina

RNA- Ribonukleinska kiselina

SFRP- engl. Secreted frizzled- related protein

ELF5- engl. Ets domain transcription like factor





## 1.UVOD

### 1.1. Posteljica

Posteljica (placenta) je privremeni organ koji ima ulogu izmjene tvari između majke i djeteta. Ona je jedini organ koji se sastoji od stanica dviju različitih osoba, od fetalnog i majčinog dijela. Fetalni je dio posteljice korion, korionska ploča, iz koje izlaze korionske resice, koje mogu biti slobodne ili usidrene u bazalnu deciduu (*decidua basalis*). One su građene od veziva s krvnim žilama koje je podrijetlom od izvanembrionalnog mezoderma. Resice oplakuje krv iz lakuna bazalne decidue i to je mjesto izmjene tvari između majke i fētusa. Majčin je dio placente je *decidua basalis*, čije stanice nastaju iz vezivnog tkiva endometralne strome, nakupljanjem glikogena i lipida. To su velike stanice koje izlučuju hormone, faktore rasta i citokine te oblažu cijelu materničnu šupljinu. Razlikuju se tri vrste decidua-stanica, ovisno o njihovom smještaju: *decidua basalis* (smještena ispod zametka), *decidua capsularis* (nalazi se na površini rastućeg zametka) i *decidua parietalis* (oblaže ostatak maternične šupljine). Majčin dio posteljice, *decidua basalis*, sadrži krvne žile majke koje se otvaraju u intravilozne prostore i sadrže majčinu krv. Fetalna i majčina krv ne miješaju se, jer ih odvajaju endotel kapilara s njegovom bazalnom laminom, vezivo, citotrofoblast i sinciotrofoblast. Te strukture čine placentarnu barijeru između majčine i fetalne krvi. Placenta je propusna za slijedeće tvari: kisik, vodu, elektrolite, ugljikohidrate, lipide, bjelančevine, vitamine, hormone (humani placentalni laktogen), pojedina protutijela i neke lijekove. Hormoni koje sintetizira placenta su korionski gonadotropin, korionski tireotropin, korionski kortikotropin, estrogene i progesteron, a sve te hormone sintetizira sinciotrofoblast (1).

## 1. UVOD

Blastocista je tvorba koja se sastoji od trofoblasta i embrioblasta. Trofoblast je vanjski sloj i predstavlja preteču posteljice, dok je embrioblast unutrašnji sloj stanica i iz njega se razvijaju embrij i pupkovina. Tijekom proliferacije trofoblasta nastaju dva sloja: citotrofoblast – unutarnji sloj koji ne dodiruje endometriju i sinciotrofoblast – vanjski sloj koji na embrionalnom polu stvara izdanke pomoću kojih prodire u endometriju. Eksperimenti provedeni ubrizgavanjem timidina pokazali su da se stanice citotrofoblata dijele i ugrađuju u sinciotrofoblast, što upućuje na zaključak da je za ispravan rast i funkciju sinciotrofoblata odgovoran pravilan rast i proliferacija citotrofoblata (2).

### 1.1.1. Patologija posteljice

U današnje vrijeme većina trudnoća i poroda je normalnog tijeka. Odluku o slanju posteljice na patološki pregled donosi porodničar na temelju podataka o tijeku trudnoće, poroda i makroskopskom pregledu posteljice nakon poroda (3). Istraživanja pokazuju da se kod čak 88% mrtvorodne djece, čija je posteljica patološki pregledana, u njoj pronađe uzrok smrti ili patološke promjene koja je dovela do tog ishoda (4). Da bi pregled posteljice bio što kvalitetniji patologu je potrebno dostaviti što više bitnih informacija koji uključuju gestacijsku dob, komplikacije trudnoće, masu djeteta, vrijednost Apgar-indeksa te spol djece kod višeplođnih trudnoća (3). Međutim, patološka pretraga posteljice nije prihvaćena u većini zemalja. Iz tog razloga predložene su smjernice prema kojima se lakše može donijeti odluka o slanju posteljice na patološku pretragu, a to su: poremećaji trudnoće u kojima se ističe čimbenik od strane majke, poremećaj trudnoće u kojima se ističe čimbenik od strane fetusa ili novorođenčeta, te promjene same posteljice u širem smislu (s ovojmima i pupkovinom) (3). Intrauterini zastoj u rastu (IUGR, engl. *intrauterine growth restriction*) svrstan je u patološke promjene uzrokovane od strane fetusa (3).

Tijekom godina opis fiziologije fetalnog rasta znatno se mijenjao, pri tome je vrlo velik doprinos ostvaren definiranjem pojmova nasljednog genetskog potencijala za rast (nasljedni, posljedica nepovoljnih okolišnih utjecaja na embrij) i stečene potpore za rast (transplacentarni dotok hranidbenih tvari). Te je pojmove definirao Gruenwald (5), a osim toga definirao je i pojam placentalne insuficijencije koja označava širok pojam posteljične disfunkcije, koja se javlja najčešće kod hipertenzivnih i diskoagulacijskih sindroma trudnoće.

Taj je pojam kasnije zamijenjen pojmovima usporeni fetalni rast te zastoj fetalnog rasta koji se koristi i danas. Zastoj fetalnog rasta definira se kao usporavanje rasta fetusa, čiji je potencijal za rast veći od izmjerenog, koji se uspoređuje sa standardima fetalnog rasta za dotičnu populaciju. Dogovorno se za minus varijantu fetalnog rasta uzima težina <10. centile za dob trudnoće, a za plus varijantu >90. centile za dob trudnoće (5). Hipotrofičnom novorođenčadi smatraju se ona ispod 10. centile, a hipertrofična ona iznad 90. centile.

IUGR se klinički dijeli na asimetrični i simetrični, te rani i kasni. Simetrični je onaj kod kojega su svi biometrijski parametri smanjeni, a kod asimetričnog su smanjeni samo masno tkivo i opseg abdomena, dok su ostali pokazatelji primjerene veličine. Asimetrični oblik najčešće nastaje zbog nedostatne funkcije posteljice. Rani zastoj rasta nastupa prije 32. tjedna gestacije i često je uzrokovan kromosomskim anomalijama, infekcijama ili ranom insuficijencijom posteljice. Kasni zastoj nastupa u zadnjem tromjesečju trudnoće, također zbog nedostatne posteljične funkcije. Uzroke IUGR-a 1/3 čine genetičke varijable, a 2/3 okolišni čimbenici. Primjer okolišnih čimbenika na koje se može preventivno utjecati jesu pušenje tijekom trudnoće, što uzrokuje više od 1/3 od svih novorođenčadi rođenih s IUGR-om (6).

## 1.2. Signalni putevi

Karakteristika svih stanica je da imaju svojstvo komunikacije. Dok jednostanični organizmi primaju samo vanjske podražaje, stanice višestaničnih organizama uz vanjske podražaje primaju i one unutarnje (molekularni signali), pomoću kojih donose odluke o rastu, dijeljenju i diferencijaciji tijekom razvoja te o ponašanju stanice u tkivu. Uzročnici tih signala različiti su proteini. Principi stanične signalizacije istraženi su na jednostavnim jednostaničnim organizmima kao što su bakterije i kvasci. Utvrđeno je da komunikacija omogućuje brojne procese, kao pokretljivost, otpornost na antibiotike, formiranje spora i konjugaciju, dok stanicama kvasca omogućuje procese pripreme za razmnožavanje. Veliki pomak u razvoju signalizacije dolazi s evolucijom višestaničnih organizama kod kojih cijeli sustav signalizacije služi za dobrobit kompletnog organizma, jer omogućuje suradnju i koordinaciju između različitih tkiva i vrsta stanica. Mehanizam signalizacije kod eukariota vrlo je složen proces. Svaka stanica može primati i odašiljati signale.

## 1. UVOD

Za prijenos signala odgovorne su ekstracelularne signalne molekule, koje mogu prenositi signal ne samo susjednim stanicama, nego i vrlo udaljenim stanicama. Za primanje signala služi stanični receptor, protein koji je smješten na površini stanice i koji se aktivira po primitku signala. To potiče kaskadnu reakciju putem signalnih molekula, što rezultira aktiviranjem jednog ili više intracelularnih signalnih puteva kojima je konačni cilj aktiviranje efektornih proteina koji primjereno odgovaraju na primljeni signal. Ovisno o vrsti signala i stanju stanice, efektorni proteini mogu biti transkripcijski regulatori, ionski kanali, dijelovi nekog metaboličkog puta ili dijelovi citoskeleta.

Humani genom sadrži više od 150 gena koji kodiraju receptorne proteine. Mnogo istih vrsta signalnih molekula koriste se u različitim vrstama signalizacije, a ključna razlika pri tome je u brzini i selektivnosti kojom se signali dostavljaju ciljnoj stanici. Pojedini stanični receptori specifični su za točno određeni signal, pa vezanje signala za stanični receptor može voditi različitim ishodima, kao što su preživljavanje stanice, rast i podjela, diferencijacija ili staničnu smrt.

Signalizacija podrazumijeva aktivaciju različitih molekula. Najčešće se ostvaruje fosforilacijom pomoću protein kinaza, koje dodaju jednu ili više fosfatnih skupina na slijedeću signalnu molekulu u kaskadi. Da bi bile spremne za novi ciklus prijenosa signala, molekule se moraju deaktivirati, dakle vratiti u početno inaktivno stanje. To se odvija procesom inaktivacije pomoću protein fosfataza koje cijepaju dodane fosfatne skupine (7).

### 1.2.1. Signalni putevi tijekom razvoja

Različiti signalni putevi mijenjaju aktivnost transkripcijskih regulatora i na taj način utječu na gensku ekspresiju, te su vrlo značajni u regulaciji embrionalnog razvoja. Među takve signalne puteve ubrajaju se i signalni putevi *Notch*, *Wnt*, *Hedgehog* i *TGFβ*. Notch signalni put najbolje je proučen kod stvaranja neurona u *Drosophila melanogaster*. Odgovoran je za formiranje, razvoj i obnovu većine tkiva u životinja. Neispravnost ovoga puta rezultira stvaranjem prevelikog broja živčanih stanica uslijed čega je broj epitelnih stanica premali, što ima smrtonosan ishod.

*Wnt* signalni put regulatorni je put važan za kontrolu razvoja animalnih organizama. *Wnt* proteini djeluju kao lokalni medijatori i morfogeni, što je dokazano proučavanjima provedenim na *Drosophili* i miševima. Kod *Drosophila melanogaster* kontroliraju razvoj krila, te otuda dolazi naziv *Wingless* gen, dok kod miševa uz prisutnost virusa taj signalni put uzrokuje tumor dojke. Ljudski genom kodira 19 *Wnt* proteina čije se funkcije često preklapaju. *Wnt* može aktivirati najmanje dva signalna puta. Kod jednog je cilj latentni transkripcijski regulator  $\beta$ -katein i taj signalni put se naziva *Wnt*/ $\beta$ -kateinput (kanonski *Wnt* put), dok drugi, tzv. planarni polaritetni put, koordinira polarizaciju stanica u razvoju epitela.

Signalni put *Hedgehog* identificiran je pri proučavanjima larve *D. melanogaster*, kod koje je utvrđeno postojanje *Hedgehog* proteina (HH). Kako je površina larvi bila prekrivena malim šiljcima, te su zbog toga podsjećale na ježa, nazvani su *hedgehog* (engl. *hedgehog* = jež). Uzrok toj morfološkoj promjeni je mutacija *hedgehog* gena, koji kod *Drosophila* kodiraju samo jedan *hedgehog* protein. Kod kralješaka su pronađene tri vrste proteina *hedgehog*: *Sonic* (SHH), *Desert* (DHH) i *Indian* (IHH)*hedgehog*. Aktivne forme proteina su kovalentno vezane s kolesterolom kao i s lancima masnih kiselina.

Njegova funkcija je aktiviranje latentnog transkripcijskog regulatora. Dakle, taj signalni put prebacuje transkripcijsku represiju u aktivaciju, pa pretjerana signalizacija dovodi do geneze tumora. Kod *Drosophila*, latentni transkripcijski regulator *Cubitus interruptus* (Ci) nalazi se u stanici vezan uz proteinski kompleks (Costal2, PKA, GSK3 i CK) koji ga fosforilira u odsutnosti HH signalizacije. Dijelovi Ci proteina translociraju se u jezgru, gdje se vežu u kompleks s korepresorom za HH gene i na taj način onemogućuju transkripciju. U prisutnosti signala, Ci protein veže se na transmembranski receptor *Patched* (PTCH) koji zatim aktivira transmembranski protein *Smoothed*. Uslijed fosforilacije i translokacije *Smoothed* proteina, Ci protein se oslobađa iz proteinskog kompleksa s kojim je bio vezan i prelazi u jezgru, gdje aktivira transkripciju *Hedgehog* gena. *Hedgehog* put je kod kralješnjaka puno kompliciraniji i slabije istražen, uslijed toga što postoje tri *Hedgehog* proteina. U stanici se nalaze tri transkripcijska regulatora Gli1, Gli2 i Gli3, koji se aktiviraju nizvodno nakon aktivacije *Smoothed* proteina. Gli 1 i 2 su, kao i Ci protein, transkripcijski aktivatori, dok Gli3 može biti i aktivator i represor. Dokazano je da taj put ima važnu ulogu u pravilnom razvoju i diferencijaciji fetalnog tkiva (7).

## 1. UVOD

PTCH protein sadrži jednu sterol-senzornu domenu i služi kao receptor za SHH, IHH i DHH signalni put. Uz *Smoothened* protein (SMO) sudjeluje u transdukciji *Hedgehog* signalnih proteina. Ima ulogu tumorskog supresora, jer u odsutnosti hedgehog signalizacije zaustavlja rast i proliferaciju stanice. U stanici je lokaliziran u membrani, i kod odraslih se nalazi u mozgu, plućima, jetri, srcu, placenti, skeletnom mišićju, gušteračii bubrežima, dok se u embriju nalazi u svim ciljnim tkivima SHH puta kao što su neuralna cijev, somiti i tkiva koja okružuju zone polarizirajuće aktivnosti udova (8).

Gli3 ima dualnu funkciju, i kao transkripcijski aktivator i kao represor te ima ulogu u razvoju udova. Njegov puni oblik (GLI3FL) ima ulogu aktivatora (GLI3A) nakon fosforilacije i nuklearne translokacije, dok njegov C-terminalni skraćeni oblik ima ulogu represora (GLI3R). Pravilna ravnoteža između aktivatora i represora određuje broj prstiju na udovima i njihov razvoj, stoga je njegov nedostatak uzrok mnogih sindroma koji su fenotipski povezani s poremećajima u razvoju udova. Unutar stanice lokaliziran je u jezgri i citoplazmi i kod zdravih ljudi nalazi se u tkivu pluća, kolona, slezene, placenti, testisa i miometrija (9).

### 1.3. Utjecaj signalnih puteva na posteljicu

Epitelno-mezenhimalni prijelaz (EMT, engl. *epithelial- mesenchymal transition*) ključan je za regulaciju humane placentacije i diferencijacije trofoblata. To je proces u kojem epitelne stanice gube polarnost i adhezivnost, i tako mijenjaju fenotip u mezenhimalni (10). EMT ima ključnu ulogu u razvoju tkiva i organa, a isto tako djeluje u obnovi tkiva i u progresiji karcinoma (11). U procesu placentacije stanice trofoblata diferenciraju se ili u vilijarne citotrofoblaste (CTB, engl. *villous cytotrophoblast*) ili u invazivne ekstavilijarne citotrofoblaste (EVT, engl. *invasive extravillous cytotrophoblast*). EVT stanice migriraju u endometriju, a da bi migracija bila uspješna stanice moraju izgubiti epitelna svojstva i postati invazivne i pokretne, što su karakteristike mezenhimalnih stanica. Takva pretvorba stanica citotrofoblata i stanica sličnih trofoblastu u mezenhimski fenotip je dokazana pokusima *in vitro*. Poveznica između EMT-a i HH signalizacije prvo je utvrđena u mnogo patoloških stanja, uglavnom karcinoma. Rezultati istraživanja ukazuju da ekspresiju EMT povezanih gena potiču *Wnt*, *Notch*, *Hedgehog* i drugi signalni putevi (12,13).

### **2. HIPOTEZA**

Posteljice sa zastojem u rastu fetusa (IUGR) imaju jače izraženu ekspresiju proteina PTCH1 i GLI3, dok je ekspresija tih proteina u kontrolnim posteljicama s normalnom trudnoćom slabije izražena.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

#### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Ciljevi istraživanja provedenog u ovom radu bili su:

1. Istražiti ekspresiju proteina PTCH1 u terminskim posteljicama zdravih trudnoća i IUGR posteljicama djece porođene u terminu.
2. Istražiti ekspresiju proteina GLI3 u terminskim posteljicama zdravih trudnoća i IUGR posteljicama djece porođene u terminu.
3. Usporediti ekspresiju PTCH1 i GLI3 proteina u terminskim zdravim i IUGR posteljicama.



### 4. MATERIJAL I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Histološki preparati tkiva posteljice istraženi su primjenom imunohistokemijske metode, pri čemu su proteini PTCH1 i GLI3 bili obilježeni protutijelima anti-PTCH1 (engl. *rabbit polyclonal anti-human*; Clone: ab-129341, Abcam, Cambridge, MA) i anti-GLI3 (engl. *rabbit polyclonal anti-human*; Clone: ab-117099, Abcam, Cambridge, MA). Primjenjen je En Vision™ postupak (Dako, Glostrup, Danska) za određivanje primarnog protutijela. Proteinska izraženost kvantificirana je stereološkom metodom analize stereološke varijable volumenske gustoće (Vv).

#### 4.2. Ispitanici

Istraživanje je provedeno na humanim posteljicama roditelja porođenih u KB-u Merkur, Zagreb. Analizirano je 15 terminskih posteljica iz trudnoća koje su protekle bez komplikacija i 15 terminskih posteljica s patologijom usporenog rasta (IUGR). Kriteriji uključivanja u studiju bili su zastoj u rastu ploda otkriven serijskim UZV mjerenjima (najmanje 2) s procjenom tjelesne težine ispod 10. centile za dob trudnoće, spol ploda i paritet majke potvrđen mjerenjem rodne mase novorođenčeta na porodu. Kriterij isključivanja iz studije za patološke trudnoće kao i za kontrole bili su: višeplodna trudnoća, pušenje majke, intrauterine virusne infekcije (TORCH, parvo 19), korioamnionitis, kronična hipertenzija, nakalemljena preeklampsija, autoimune bolesti majke. Svaka roditelja potpisala je informirani pristanak za korištenje uzorka njene posteljice sasvrhom znanstvenih istraživanja. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KB-a Merkur, Zagreb, Odlukom od 22.9.2011. godine.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.3. Metode

#### 4.3.1. Imunohistokemija

Nakon poroda kontrolne i patološke posteljice patohistološki su analizirane. Uzorci tkiva rutinskim laboratorijskim tehnikama uklopljeni su u parafinske blokove, nakon čega su rezani pomoću mikrotona na debljinu 4  $\mu\text{m}$  i postavljeni na predmetna stakalca.

Prije imunohistokemijskog bojenja preparati su prvo deparafinirani u termostatu pri temperaturi 58 – 60°C preko noći, a zatim kroz red ksilola (4x10min), te su nakon toga rehidrirani kroz silazni red alkohola (100% EtOH 5min, 96% EtOH 5min, 70% EtOH 2min) i isprani destiliranom vodom. Nakon toga je slijedio postupak demaskiranja antigena, tj. oslobađanje epitopa (tj. mjesta za koje će se vezati antigen).

S obzirom na to da je tkivo fiksirano u formalinu koji stvara križne veze, prvo je obrađeno proteolitičkim enzimom za demaskiranje. U tu svrhu korišten je citratni pufer (pH6, razrjeđenja 1:10) i tkivo je ostavljeno u mikrovalnoj pećnici 2x10min na 600W. Tijekom tog postupka antigeni mijenjaju svoju konfiguraciju, pa je jako bitno da nema temperaturnih šokova, tj. da se uzorci postupno zagrijavaju i postupno hlade te da se održava stalan pH pomoću pufera. Djelovanje endogene peroksidaze blokirano je u 3%-tnom vodikovom peroksidu ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 10min, zatim su preparati isprani dva puta po 3min u TBS puferu te je nanijeto primarno protutijelo u razrjeđenjima anti-PTCH1 1:500 (engl. *rabbit polyclonal anti-human*; Clone: ab-129341, Abcam, Cambridge, MA) i anti-GLI3 1:200 (engl. *rabbit polyclonal anti-hman*; Clone: ab-117099, Abcam, Cambridge, MA). Preparati su zatim inkubirani preko noći na temperaturi 4°C. Primarno protutijelo neobilježeno je i veže se na antigen od interesa. Da bi ga detektirati koristi se sekundarno protutijelo koje je obilježeno kromogenom i ono je ciljno usmjereno na Fc fragment primarnog protutijela, a služi za pojačavanje signala. Nakon inkubacije preparati su isprani TBS puferom 2x3min i dodano je sekundarno protutijelo za koje je korišteno En Vision TM sustav vizualizacije (Dako, Glostrup, Danska). Sekundarno protutijelo inkubira no je 30min na sobnoj temperaturi. Preparati su zatim ponovno ispirani TBS puferom 2x3min, te je zatim na njih stavljen DAB kromogen i inkubiran 10min. DAB kromogen oskidira uz supstrat (vodikov peroksid) koji se nalazi u sekundarnom protutijelu i istaloži se na mjestima na kojima je došlo do imunološke reakcije. Preparati se ispiru običnom, zatim destiliranom vodom i kontrastira hematoksilinom 10min. Hematoksilin sve kisele tvorbe boja plavo: DNA, RNA jezgre.

Nakon kontrastiranja ispire se 3puta i po 5min u običnoj vodi, a zatim se ispere u destiliranoj vodi. Zatim slijedi dehidriranje uzoraka kroz uzlazni red alkohola (70% EtOH i 96% EtOH nekoliko urona, 100% EtOH 1min, 100% EtOH 2min) te bistrenje u ksilolu dva puta po 5min. Na kraju su preparati pokriveni pokrovnim stakalcem i time su bili spremni za mikroskopiranje (14).

### 4.3.2. Stereologija

Izraženost proteina PTCH1 i GLI3 kvantificirana je primjenom stereološke metode.

Uzorci su presječeni jednom ravninom na kojoj je dobivena dvodimenzionalna slika koju prvo treba kvalitativno analizirati da bi upoznali sastavne dijelove uzorka. To je učinjeno pomoću svjetlosnog mikroskopa, pri povećanju 100x. Za daljnju kvantitativnu analizu sastavni dijelovi tkiva uzorka moraju biti jasno razgraničeni, jer stereološkom metodom se ne obrađuju područja koja se međusobno prelijevaju.

Za testiranje uzoraka korišten je Weibelov mnogonamjenski testni sustav s 42 točke, pri povećanju od 400x. Ukupna duljina testnih linija (Lt) iznosila je 1,008mm, a testna površina (At) 0,0837 mm<sup>2</sup> za svako analizirano mikroskopsko polje. Analizirano je pet vidnih polja u bazalnoj decidui i 20 vidnih polja u korionskim resicama. U vidnim poljima brojane su točke pozitivne na prisutnost PTCH1 i GLI3 proteina u stanicama.

Za PTCH1 i GLI3 analizirana je volumenska gustoća (Vv) (15).

### 4.4. Statističke metode

Za statističku obradu podataka korišten je statistički program GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA), i parametrijski testovi Studentov t-test i ANOVA te neparametrijski testovi Mann-Whitneyjev i Kruskal-Wallisov.

## 5. REZULTATI

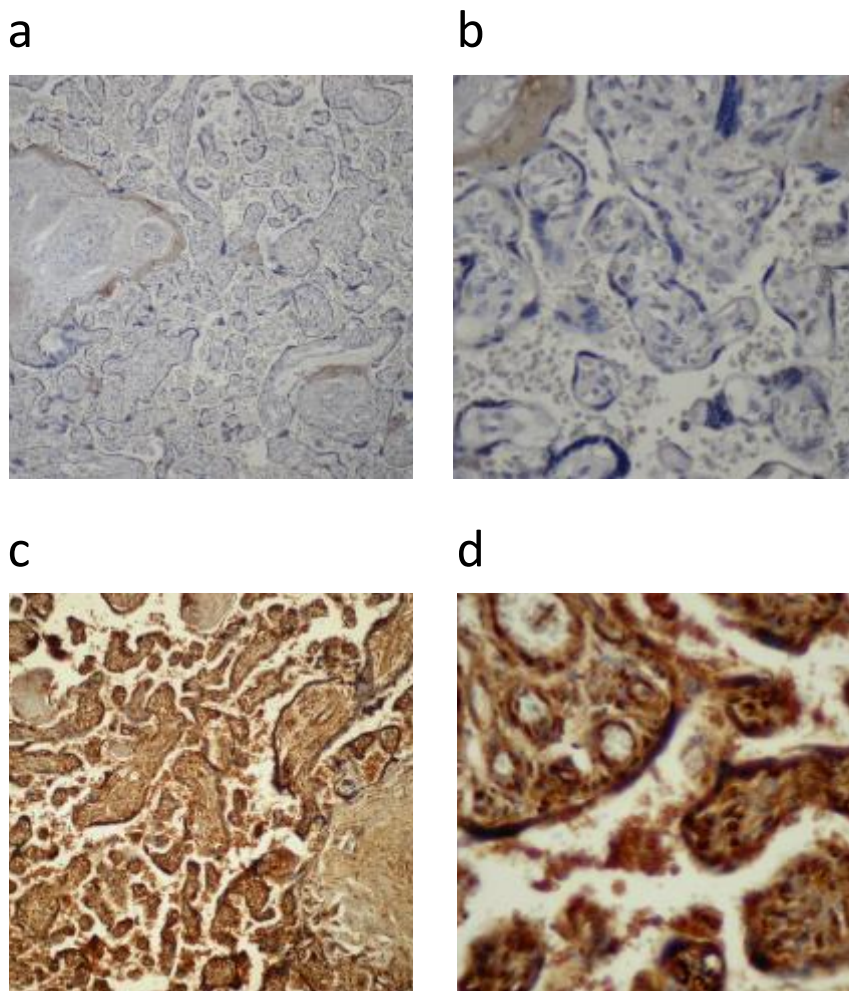
### 5. REZULTATI

Ekspresija proteina PTCH1 i GLI3 istražena je u kontrolnim terminskim posteljicama i uspoređena s posteljicama iz terminskih patoloških trudnoća.

Ukupno je analizirano 30 posteljica.

#### 5.1. Ekspresija PTCH1 proteina

Na Slici 1. prikazana je ekspresija PTCH1 proteina u patološkim IUGR posteljicama i kontrolnoj skupini terminskih posteljica. Protein PTCH1 intenzivno boji membranu stanica trofoblasta kao i membranu stromalnih stanica placentalnih resica.



Slika 1. Imunohistokemijska ekspresija PTCH1 proteina u posteljicama patoloških trudnoća s IUGR te kontrolnih skupina. a) kontrolna skupina (povećanje mikroskopa 100x), b) kontrolna skupina (povećanje mikroskopa 400x), c) IUGR (povećanje mikroskopa 100x), d) IUGR (povećanje 400x). Fotografirala autorica.

### 5.1.1. Usporedba ekspresije PTCH1 u posteljicama s IUGR-om i u kontrolnoj skupini terminskih posteljica

U Tablici 1. su prikazani rezultati kvantifikacije ekspresije volumenske gustoće PTCH1 antigena u analiziranim posteljicama.

Uočava se statistički značajno jača ekspresija proteina PTCH1 u posteljicama kod terminskog intrauterinog zastoja u rastu ploda (IUGR) u odnosu na kontrolu (tkivo posteljice iz trudnoće bez komplikacija) ( $p < 0,0001$ ; Mann-Whitneyjev test)

Tablica 1. Usporedba posteljica s IUGR-om i kontrolne skupine terminskih posteljica

Status	Br. Uzoraka	Ekspresija PTCH1
IUGR	15	0,2430
KONTROLA	15	0,1520
Ukupno	30	

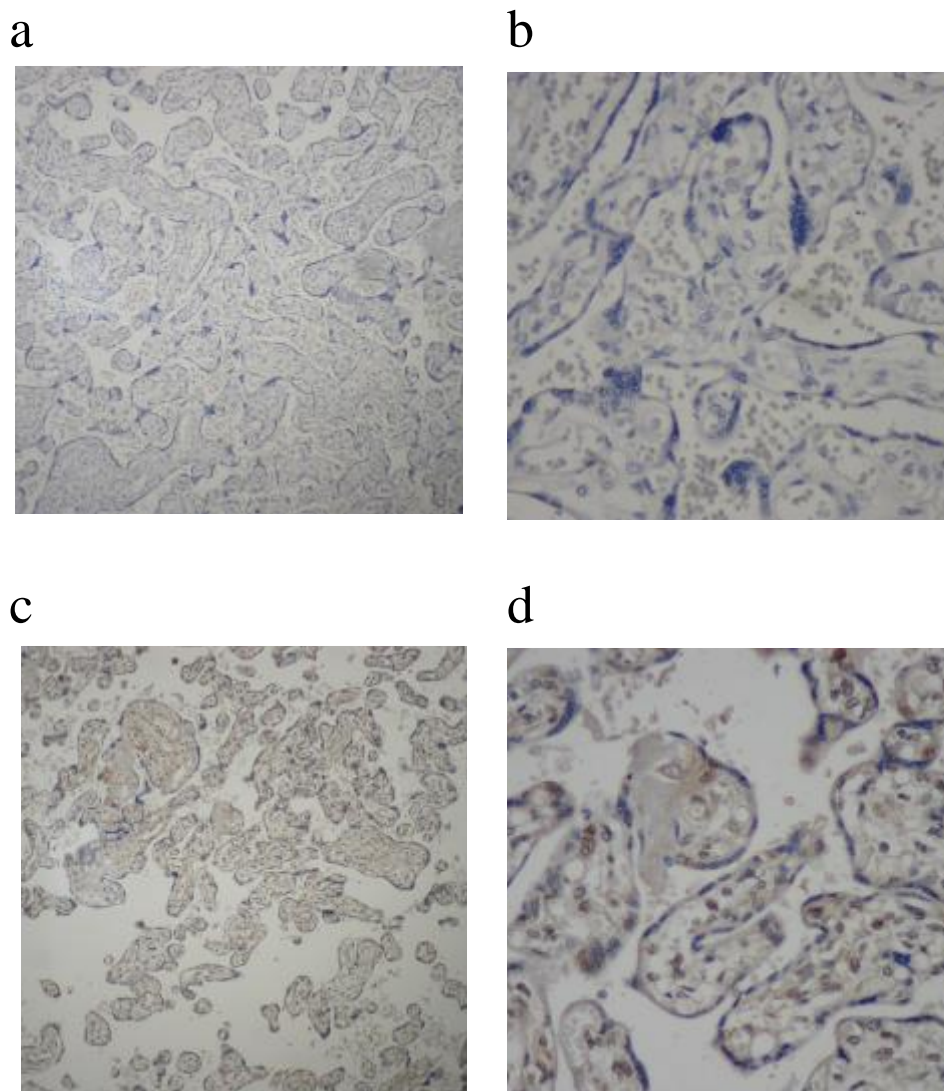
$p < 0,05$

## 5. REZULTATI

### 5.2. Ekspresija GLI3 proteina

Protein GLI3 prisutan je u jezgri stanica korionskih resica trofoblasta.

Na Slici 2. prikazana je ekspresija GLI3 proteina u patološkim IUGR posteljicama i kontrolnoj skupini terminskih posteljica.



Slika 2. Imunohistokemijska ekspresija GLI3 proteina u posteljicama patološki trudnoća s IUGR te kontrolnih skupina. a) kontrolna skupina (povećanje mikroskopa 100x), b) kontrolna skupina (povećanje mikroskopa 400x), c) IUGR (povećanje mikroskopa 100x), d) IUGR (povećanje 400x). Fotografirala autorica.

### 5.2.1 Usporedba ekspresije GLI3 u posteljicama s IUGR-om i u kontrolnoj skupini terminskih posteljica

Uočena je statistički značajno jača ekspresija proteina GLI3 u posteljicama kod terminskog intrauterinog zastoja u rastu ploda (IUGR) u odnosu na kontrolu (tkivo posteljice iz trudnoće bez komplikacija) ( $p < 0,0001$ ; Mann-Whitneyjev test)

U Tablici 2. prikazani su rezultati kvantifikacije ekspresije volumenske gustoće GLI3 antigena u analiziranim posteljicama. Rezultati su prikazani kao medijani.

Tablica 2. Usporedba posteljica s IUGR-om i kontrolne skupine terminskih posteljica

Status	Br. Uzoraka	Ekspresija GLI3
IUGR	15	0,4480
KONTROLA	15	0,2590
Ukupno	30	

$p < 0,05$

## 5. REZULTATI

### 5.3. Usporedba ekspresije PTCH1 i GLI3 u posteljicama s IUGR-om i u kontrolnoj skupini terminskih posteljica

Utvrđena je statistički značajno jača ekspresija proteina PTCH1 i GLI3 u posteljicama kod terminskog intrauterinog zastoja u rastu ploda (IUGR) u odnosu na kontrolu (tkivo posteljice iz trudnoće bez komplikacija). Također, ekspresija GLI3 kod terminskih IUGR posteljica i kod kontrolnih posteljica značajno je veća od ekspresije proteina PTCH1 u istima. (Slika 3., Slika 4.).

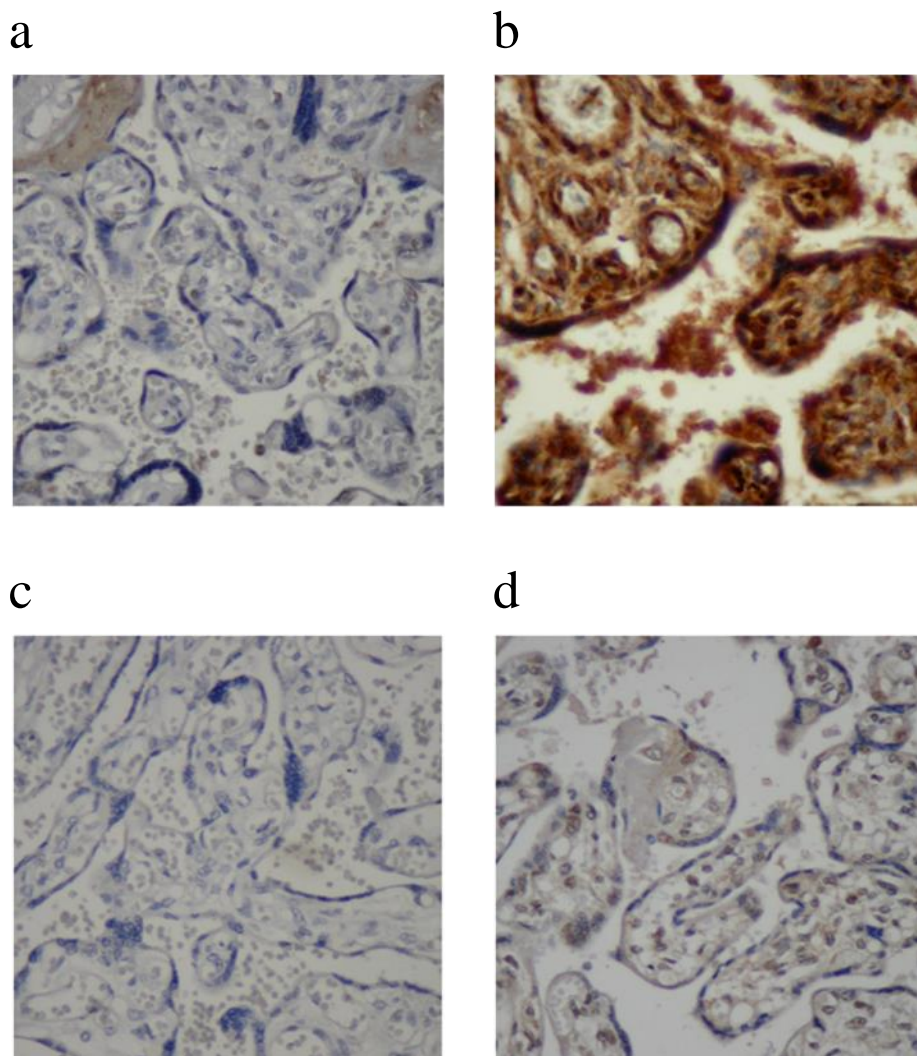
U Tablici 3. prikazani su rezultati kvantifikacije ekspresije volumenske gustoće PTCH1 i GLI3 antigena u analiziranim posteljicama.

Tablica 3. Usporedba posteljica s IUGR-om i kontrolne skupine terminskih posteljica

Status	Br. Uzoraka	Ekspresija
IUGR PTCH1	15	0,2430
Kontrola PTCH1	15	0,1520
IUGR GLI3	15	0,4480
Kontrola GLI3	15	0,2590
Ukupno	60	

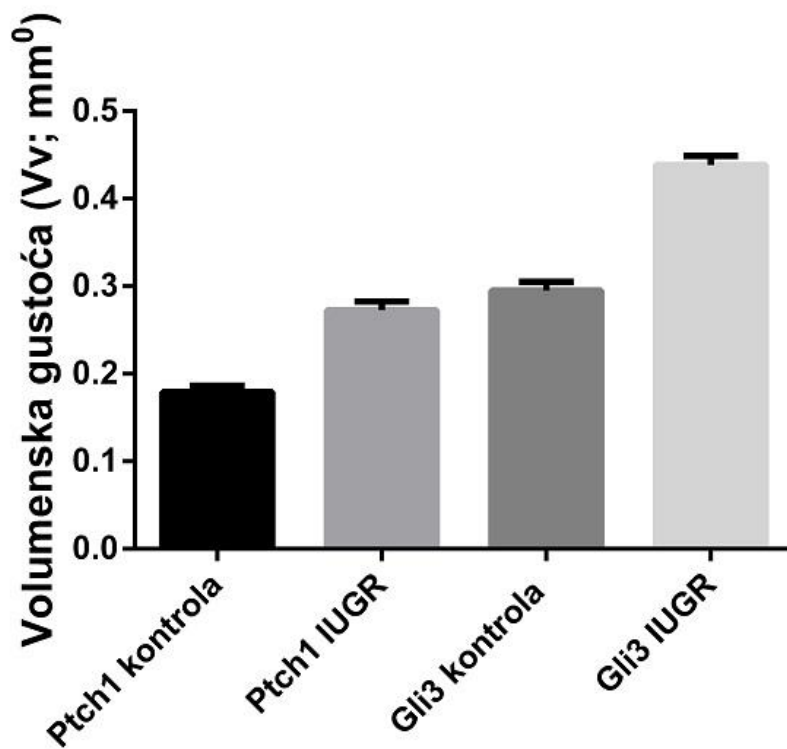
$p < 0,05$





Slika 3. Imunohistokemijska ekspresija PTCH1 i GLI3 proteina u posteljicama patoloških trudnoća s IUGR te kontrolnih skupina. a) ekspresija PTCH1 proteina u kontrolnoj skupini (povećanje mikroskopa 400x), b) ekspresija PTCH1 proteina u patološkim posteljicama s IUGR (povećanje mikroskopa 400x), c) ekspresija GLI3 proteina u kontrolnoj skupini (povećanje mikroskopa 400x), d) ekspresija GLI3 proteina u patološkim posteljicama s IUGR (povećanje 400x). Fotografirala autorica.

## 5. REZULTATI



Slika 4. Prikaz volumenske gustoće PTCH1 i GLI3 antigena (Vv, mm<sup>0</sup>) u posteljicama kod terminskog intrauterinog zastoja u rastu ploda (IUGR) i u terminskim kontrolama.

## 6. RASPRAVA

U ovom radu analizirana je ekspresija proteina uključenih u diferencijaciju stanica trofoblasta u zdravim posteljicama te u posteljicama sa zastojem u rastu ploda (IUGR).

Da bi implantacija bila uspješna, maternica mora biti pripremljena za primanje embrija, a trofoblast mora biti sposoban za prodiranje u endometriju. U tim procesima *Wnt* signalni put utječe na razvoj mjesta gdje će se embrij implantirati i kasnije nastati placenta, a IHH signalni put sinkronizira dijelove tkiva unutar maternice zajedno s progesteronom koji priprema maternicu za implantaciju. Sličan učinak IHH-u kod miševa ima transkripcijski faktor 2 čiji nedostatak uzrokuje neuspješnu implantaciju i razvoj decidue (16). Oni su pod stalnom kontrolom niza molekularnih mehanizama, od kojih najvažniji formiraju različite signalne puteve. Jedan od signalnih puteva je i *Hedgehog* put, s ključnim proteinima PTCH i GLI3. Najvažniji događaj placentacije je epitelno-mezenhimna tranzicija (EMT) koja omogućuje intersticijsku i endovaskularnu invaziju stanica trofoblasta, ali i obratni proces, mezenhimno-epitelne tranzicije koji doprinosi zaustavljanju invazije stanica trofoblasta. Kako *Hedgehog* signalni put regulira ekspresiju EMT-povezanih gena, u odrasloj dobi poremećaj tog mehanizma može uzrokovati razvoj raznih bolesti i potaknuti metastaze, dok je u fetalnom razdoblju nužan preduvjet za rođenje zdravog djeteta. Istraživanja su pokazala da je HH signalizacija neophodna za razvoj većine sustava u kralješnjaka. SHH je izražen kod razvijanja živčanog sustava i epitelnih tkiva, IHH prvenstveno utječe na razvoj kostiju, a DHH je aktivan u razvoju perifernog živčanog sustava i reproduktivnih organa (17). Na temelju dosadašnjih in vivo istraživanja hipoteza ovog rada bila je da će u tkivima sa slabije izraženom invazivnošću trofoblasta, dakle onima koja su rezultat neuspješne invazije decidue, prijenos signala *Hedgehog* putem biti smanjen zahvaljujući pojačanoj ekspresiji PTCH i GLI proteina. Prema dosadašnjim spoznajama neuspješna invazija trofoblasta zapažena je u posteljicama fetusa sa zastojem u rastu i u hipertenzivnim poremećajima (18,19). Rezultati ovog istraživanja pokazali su statistički značajno jaču ekspresiju proteina PTCH1 i GLI3 u terminskim IUGR posteljicama u odnosu na kontrolnu skupinu terminskih posteljica ( $p < 0,05$ , Mann-Whitneyjev test). Dobiveni rezultati u skladu su s diferentnim podacima istraživanja gdje su negativni regulatori invazije trofoblasta bili jače izraženi u IUGR posteljicama, poput obitelji SFRP (engl. *Secreted frizzled-related protein*) proteina *Wnt* signalnog puta (20) te proteina ELF5 (21), dok su pozitivni regulatori poput proteina Snail bili slabije izraženi (22).

## 6. RASPRAVA

Rezultati navedenih istraživanja ukazuju da je regulacija invazije trofoblasta jedan od važnih čimbenika patologije trudnoće, što je u skladu s rezultatima dobivenim u istraživanjima provedenim u ovom radu.

Daljnja istraživanja na ovom području nužna su zbog boljeg razumijevanja patologije trudnoće, ali isto tako i zbog boljeg poznavanja ponašanja tumorskih stanica. One koriste iste signalne puteve koji su bitni u razvoju placente i fetusa, ali u krivo vrijeme, na krivom mjestu.

Zaključno možemo reći da pojačana ekspresija *Hedgehog* signalnih molekula u uzorcima terminskih IUGR posteljica može imati za posljedicu smanjenu EMT ekstraviloznog trofoblasta. Nedovoljno invazivni trofoblast može uzrokovati slabiju invaziju u deciduu što može dovesti do intrauterinog zastoja u rastu djeteta, što potvrđuje ulogu *Hedgehog* proteina u razvoju normalne posteljice i rođenja zdravog djeteta.

## 7. ZAKLJUČAK

Analiza ekspresije dva proteina *Hedgehog* signalnog puta, PTCH1 i Gli3, u posteljicama sa zastojem u rastu ploda, pokazala je da je:

1. Ekspresija PTCH1 proteina u IUGR posteljicama značajno povećana u odnosu na posteljice zdravih terminskih trudnoća
2. Ekspresija GLI3 proteina u IUGR posteljicama značajno povećana u odnosu na posteljice zdravih terminskih trudnoća
3. Ekspresija GLI3 proteina u IUGR posteljicama i u posteljicama zdravih terminskih trudnoća značajno povećana u odnosu na ekspresiju PTCH1 proteina.

## 8. SAŽETAK

### 8. SAŽETAK

#### 8.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada bio je istražiti ekspresiju ključnih proteina *Hedgehog* signalnog puta, PTCH1 i GLI3, koji su važni regulatori rasta i razvoja ploda. Njihova ekspresija uspoređivana je u posteljicama sa zastojem u rastu ploda (IUGR) i u terminskim posteljicama zdravih trudnoća.

#### 8.2. Nacrt studije

Preparati su pripremljeni primjenom klasične histološke tehnike, nakon koje je slijedilo imunohistokemijsko bojenje. Proteini PTCH1 i GLI3 obilježeni su anti-PTCH1 i anti-GLI3 protutijelima, a korišten je En Vision<sup>TM</sup> postupak. Proteinska izraženost kvantificirana je stereološkom metodom.

#### 8.3. Ispitanici i metode

Istraživanje je provedeno na humanim posteljicama roditelja porođenih u KB-u Merkur. Analizirano je 15 terminskih posteljica iz zdravih trudnoća bez komplikacija i 15 terminskih posteljica s patologijom usporenog rasta (IUGR). Za obradu uzoraka korištene su sljedeće metode histološke obrade preparata: imunohistokemija, stereologija, Studentov t-test, ANOVA, Mann-Whitneyjev i Kruskal-Walisonvtest.

#### 8.4. Rezultati

Ekspresija proteina PTCH1 i GLI3 značajno je pojačana u posteljicama kod terminskog intrauterinog zastoja u rastu (IUGR), u odnosu na tkivo posteljica iz trudnoća bez komplikacija (kontrolna skupina) ( $p < 0,0001$ ; Mann-Whitneyjev test). Također, ekspresija GLI3 proteina u terminskim IUGR posteljicama i u kontrolnim zdravim posteljicama statistički je značajno jača od ekspresije proteina PTCH1 u istima. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima sličnih istraživanja prikazanim u literaturi.

#### 8.5. Zaključak

Ekspresija PTCH1 i GLI3 proteina u IUGR posteljicama značajno je veća u odnosu na posteljice zdravih terminskih trudnoća.

Ključne riječi: *Hedgehog* signalni put; imunohistokemija; IUGR; proteini GLI3, PTCH1.

## 9. SUMMARY

Expression of the Hedgehog signalling pathway proteins in human placentas

### 9.1. Objectives

The aim of this study was to explore the expression of the Hedgehog signalling pathway proteins, PTCH1 and GLI3, which are important regulators of foetal growth and development. We compared their expression in human placentas with IUGR and term placentas of healthy pregnancies.

### 9.2. Study design

Firstly, we processed the samples histologically and then with immunohistochemical methods. PTCH1 and GLI3 proteins were marked with anti-PTCH1 and anti-GLI3 antibodies, then we used En Vision™ procedure. Protein expression was quantified using the stereological method.

### 9.3. Participants and methods

Research was done on human placentas of women who had given birth at Merkur Clinical Hospital. We analysed 15 term placentas from healthy pregnancies without complications and 15 term placentas with IUGR pathology. We treated samples with following methods: immunohistochemistry, stereology, then analysed them using Student's t-test, ANOVA, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis's tests.

### 9.4. Results

Expression of PTCH1 and GLI3 proteins was significantly increased in term placentas with IUGR in relation to controls (placenta tissues from pregnancy without complications) ( $p < 0.0001$ ; Mann-Whitney test). Also, GLI3 expression in term IUGR placentas and in control healthy placentas were statistically significantly increased in regard to PTCH1 expression. Results obtained are in accordance with those from other researches where negative regulators of trophoblast invasion (like PTCH1 and GLI3) were also increased in IUGR placentas.

### 9.5. Conclusion

PTCH1 and GLI3 protein expression in IUGR placentas are significantly increased in comparison to their expression in term placentas of healthy pregnancies.

Key words: Hedgehog signalling pathway; immunohistochemistry; IUGR; proteins GLI3, PTCH1.

## 10. LITERATURA

### 10. LITERATURA

1. Bradamante Ž, Kostović- Knežević Lj, Osnove histologije, prema 7. američkom izdanju, Zagreb, Školska knjiga, 1995.
2. Kos M, Leniček T. Osnove patologije posteljice. Zagreb: Medicinska naklada; 2011, poglavlje 2: 7-27.
3. Kos M, Leniček T. Osnove patologije posteljice. Zagreb: Medicinska naklada; 2011, poglavlje 1: 2-5.
4. Kidron D, Bernheim J, Aviram R. Placental findings contributing to fetal death, a study of 120 stillbirths between 23 and 40 weeks gestation. *Placenta* 2009;30:700-4.
5. Dražančić A. Krivulje fetalnog rasta, usporeni fetalni rast i fetalna dismaturnost. *Gyneacol Perinatol* 2009;18(1);1-12.
6. Wollmann H. Intrauterine growth restriction: definition and etiology. *Suppl* 2: 1-6, 1998.
7. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., i sur., *Molecular Biology of the cell*. 6 izd. New York: Garland Science; 2015.
8. Quijada L., Callejo A., Torroja C., Guerrero I., *The Patched Receptor: Switching On/Off the Hedgehog Signaling Pathway*. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013.
9. Aberger F., ur. Schwab M. *Encyclopedia of Cancer*, Springer Berlin, 2011.
10. S. Lamouille, J. Xu, R. Derynck, Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (3) (2014) 178–196.
11. A. Puisieux, T. Brabletz, J. Caramel, Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors, *Nat. Cell Biol.* 16 (6) (2014) 488–494.
12. Tang C. Mei L. Pan L. Xiong W. Haibin Z. Hongfeng R. i sur. Hedgehog signaling through Gli1 and Gli2 is required for epithelial- mesenchymal transition in human trophoblast. Elsevier.2015
13. Gonzalez DM. Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial- mesenchymal transition. *Sci Signal.* 2014; 7(344): re8.
14. [http://www.medri.uniri.hr/files/NASTAVA/PATOLOGIJA/NASTAVNO\\_GRADIVO/IMUNOHISTOKEMIJA\\_I\\_IN\\_SITU\\_HIBRIDIZACIJA.pdf](http://www.medri.uniri.hr/files/NASTAVA/PATOLOGIJA/NASTAVNO_GRADIVO/IMUNOHISTOKEMIJA_I_IN_SITU_HIBRIDIZACIJA.pdf) (pristupljeno 22.6.2017)



15. Kališnik M. Temelji stereologije. 1. izd. Ljubljana. Stereološka sekcija, Institut za histologiju I embriologiju. 1985.
16. Fritz R, Jain C, Armant D.R. Cell signaling in trophoblast- uterine communication. *Int. J. Dev. Biol.* 2014. 58: 261- 271
17. Ryan KE, Chiang C. Hedgehog Secretion and Signal Transduction in Vertebrates. *J Biol Chem.* 2012; 287(22): 17905–17913.
18. 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? *J Clin Invest* 1997;99:2152-64.
19. Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA i sur. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1991;98:648-55.
20. Partl JZ, Fabijanovic D, Skrtic A, Vranic S, Martic TN, Serman L. Immunohistochemical expression of SFRP1 and SFRP3 proteins in normal and malignant reproductive tissues of rats and humans. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014 Oct;22(9):681-7.
21. Jurkovic I, Gecek I, Skrtic A, Zmijanac Partl J, Nikuseva Martic T, Serman A, Galesic Ljubanovic D, Serman Lj. ELF5 transcription factor expression during gestation in humans and rats - an immunohistochemical analysis. *Matern Fetal Neonatal Med.* 2017 Jun;30(11):1261-1266.
22. Fan M, Xu Y, Hong F, Gao X, Xin G, Hong H, Dong L, Zhao X. Rac1/ $\beta$ -Catenin Signalling Pathway Contributes to Trophoblast Cell Invasion by Targeting Snail and MMP9. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(4):1319-32.

## 10. LITERATURA

## 11. ŽIVOTOPIS

### Opći podatci:

- Ime i prezime: Lea Kottek
- Datum i mjesto rođenja: 30. listopada 1992., Zagreb
- Adresa stanovanja: Milana Rešetra 23, Zagreb
- E-mail: [lea.kottek@gmail.com](mailto:lea.kottek@gmail.com)

### Obrazovanje:

- Ženska opća gimnazija Družbe sestara milosrdnica s pravom javnosti
- Zdravstveno veleučilište Zagreb, Preddiplomski stručni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike
- Medicinski fakultet u Osijeku, Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike