

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Ćujić R. Danica

**UTICAJ STEROIDNIH HORMONA I
NJIHOVIH ANTAGONISTA NA NIVOE
GALEKTINA U ĆELIJAMA
TROFOBLASTA ĆOVEKA *in vitro***

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Ćujić R. Danica

**THE EFFECT OF STEROID HORMONES
AND THEIR ANTAGONISTS ON
GALECTINS' LEVELS IN HUMAN
TROPHOBLAST CELLS *in vitro***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Članovi komisije

Dr Slavica Spasić, profesor emeritus, mentor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Žanka Bojić-Trbojević, naučni saradnik, mentor
Univerzitet u Beogradu – Institut za primenu nuklearne energije

Dr Ljiljana Vićovac Panić, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za primenu nuklearne energije

Datum odbrane: _____

*Ono što je teško uradićemo odmah, za
ono što je nemoguće biće nam potrebno neko vreme.
(„Lubav malim slovima“, Francesc Miralles)*

Zahvalnica

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

Ovaj rad je izrađen pod rukovodstvom dr Žanke Bojić-Trbojević, naučnog saradnika INEP-a. Svojoj mentorki najiskrenije zahvaljujem na stručnoj pomoći i korisnim sugestijama koje su mi olakšale da prevaziđem sve prepreke tokom izrade ovog rada, a posebno na podršci, razumevanju i strpljenju koje je pokazala za sve moje ideje i planove.

Dr Ljiljani Vićovac Panić zahvaljujem na poverenju koje mi je ukazala kao članu svog tima, na savetima i podršci koje mi je pružila tokom proteklih godina, a najviše tome što me je naučila da razvijem kritički i objektivan odnos prema sopstvenim rezultatima.

Dr Slavici Spasić, profesoru emeritusu Farmaceutskog fakulteta, zahvaljujem na korisnim sugestijama i oceni ovog rada.

Zahvaljujem svim kolegama sa Instituta za primenu nuklearne energije na kolegijalnoj podršci i pomoći tokom izrade ove teze, pre svega imunolozima mr Miomiru Petroviću, dr Saši Vasilevu i Blagoju Milosavljeviću na pomoći oko pripreme poliklonskih antitela prema galektinu-1 i „RIA devojkama“ Jasmini Marinković i Tanji Živanović na pomoći oko određivanja steroidnih hormona. Svojim dragim kolegama iz grupe Nikoli, Ivani, Milici i Tamari zahvaljujem na saradnji, nesebičnoj razmeni iskustva i prijateljskoj podršci tokom naših zajedničkih dana u laboratoriji.

Zahvaljujem se dr Nataši Tošić i dr Sonji Pavlović, kolegamicama sa Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, na pruženoj pomoći oko real-time PCR tehnike.

Najtoplije se zahvaljujem porodici i tetki Nadi na pruženoj ljubavi, razumevanju i pružanju oslonca onda kada je to bilo najpotrebnije.

Rezime

Galektini su evolutivno očuvana grupa lektina, sa afinitetom prema β -galaktozidnoj strukturi. Zahvaljujući lektinskoj aktivnosti, galektini su uključeni u regulaciju vitalnih ćelijskih procesa kao što su preživljavanje ćelija, apoptoza, regulacija ćelijskog ciklusa, obrada iRNK transkripta, ćelijska adhezija i migracija. Postoje indicije da su galektini uključeni u različite reproduktivne procese, uključujući i proces implantacije embriona i placentacije, kao preduslova za razvoj fetusa. Iako mehanizmi nisu nedovoljno poznati, ekspresija galektina je precizno regulisana i može biti specifična za određeno tkivo ili fazu razvića.

Steroidni hormoni imaju važnu ulogu u pripremi, uspostavljanju i održavanju trudnoće. Ćelije ekstravilusnog trofoblalsta (EVT) ne sintetišu steroidne hormone, ali prisustvo odgovarajućih receptora omogućava da steroidni hormoni mogu ispoljiti svoje delovanje na ove ćelije. U ćelijama EVT je pokazano prisustvo galektina-1, -3 i -8. Poznavanje regulacije ekspresije galektina u EVT je veoma oskudno, ali postoje podaci za druga tkiva koji ukazuju na ulogu steroidnih hormona. U promotorskim regionima gena za ova tri galektina prisutne su odgovarajuće *hormon-response* sekvence, pa postoji mogućnost da steroidni hormoni mogu uticati na ekspresiju galektina-1, -3 i -8. U ovom radu je ispitan uticaj steroidnih hormona progesterona (P_4), 17β -estradiola (E_2) i testosterona (TE), zatim sintetskog analoga kortizola, deksametazona (DEX), kao i odgovarajućih antagonista steroidnih hormona na nivoe galektina-1, -3 i -8 u EVT ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo. Efekat je praćen na nivou genske ekspresije, sadržaja galektina unutar ćelija, kao i mogućim promenama u sekreciji. Dobijeni rezultati su pokazali da su galektini-1, -3 i -8 u EVT ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo modulirani steroidnim hormonima, steroid specifično i zavisno od doze. Steroidni hormoni mogu različito delovati na transkripciju gena (iRNK), na nivoe intracelularnih galektina, odnosno na galektine sekretovane van ćelija. Nivo iRNK za *LGALS1*, kao i nivoi galektina-1 u ćelijama i galektin-1 oslobađen van ćelija su bili povišeni pri koncentraciji od 10 nM E_2 , dok su pri višoj koncentraciji (1000 nM) bili smanjeni. S druge strane, nivo proteina galektina-3 i njegova sekrecija su stimulisani P_4 (10 nM). U prisustvu mifepristona, antagonista glukokortikoida i progesterona, uočen je efekat na nivoe galektina-1 i -3 suprotan u odnosu na P_4 , što sugeriše da je ova regulacija posredovana progesteronskim receptorom. Iako su uočene najmanje promene kod galektina-8 pod

uticajem steroidnih hormona, njegova sekrecija je povećana nakon tretmana P₄, DEX i E₂ (10 nM). Ispitivanjem uticaja E₂ na funkcionalna svojstva HTR-8/SVneo ćelija pokazano je da ovaj steroidni hormon nezavisno od doze, inhibira migratorna i invazivna svojstva EVT *in vitro*.

Analizom galektina-1, izolovanog iz placente, pokazano je da je ovaj protein sačuvao svoja strukturna, lektinska i imunogena svojstva. Utvrđeno je i prisustvo različitih molekulskih formi placentnog galektina-1, od kojih su detektovane forme koje odgovaraju i oksidovanom i redukovanom galektinu-1. Galektin-1 može se jednostavno odrediti ELISA testom, zasnovanom na poliklonskim antitelima dobijenim imunizacijom kunića placentnim galektinom-1. Time je omogućeno dalje ispitivanje značaja galektina-1 kao potencijalnog biomarkera.

Ključne reči: galektin, trofoblast, HTR-8/SVneo ćelije, steroidni hormoni, regulacija, ekspresija, sekrecija, placentni galektin, ELISA

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 577.17.5/.6:577.112:57.085.2(043.3)

Abstract

Galectins are an evolutionarily conserved lectin family, with affinity for β -galactosides. Galectins are involved in regulation of vital cellular processes such as cell survival and apoptosis, regulation of cell cycle, RNA splicing, cell adhesion and migration. Galectins are assumed to participate in different reproductive processes including embryo implantation and placentation, and fetal development. Despite paucity of data, galectins seem to be precisely regulated, they are expressed in different tissues, or are specific for certain developmental phases.

Steroid hormones are well known for their role in priming, establishing and maintenance of pregnancy. Extravillous trophoblast (EVT) cells do not synthesize steroid hormones, but are steroid-responsive, and steroid receptors are expressed in EVT cells. Three members of the galectin family are detected in EVT, galectin-1, -3 and -8. However, not much is known regarding regulation of galectins' expression in EVT. The presence of corresponding hormone-response sequences in promoters of genes for galectins indicate that steroid hormones could regulate galectins-1, -3 and -8. In this study, the effect of steroid hormones progesterone (P_4), 17β -estradiol (E_2) and testosterone (TE), synthetic cortisol analog dexamethasone (DEX), as well as relevant steroid hormone antagonists on galectin-1, -3 and -8 levels in EVT cell line HTR-8/SVneo was investigated. The effect was studied at both RNA and galectin protein levels, following intracellular content, and secreted galectins. The results obtained showed that galectins-1, -3 and -8 in EVT cell line HTR-8/SVneo are modulated by steroid hormones, in steroid and dose-specific manner. Steroid hormones had different impact at gene expression (mRNA level), intracellular galectins and secreted galectins. *LGALS1* gene expression, total cellular galectin-1 and secretion of this protein were increased with low concentration of E_2 (10 nM), while higher concentration (1000 nM) had inhibitory effect on mRNA, total cellular galectin-1 and galectin-1 secretion. On the other hand, intracellular galectin-3, and secretion of galectin-3 were increased with P_4 (10 nM). Mifepristone, a synthetic, steroidal antiprogesterone and antiglucocorticoid, had the opposite effect to P_4 on galectin-1 and -3 levels, suggesting the progesterone receptor involvement. Galectin-8 was the least sensitive to treatment with steroid hormones. Nevertheless, secretion of galectin-8 was increased with P_4 , DEX and E_2 (10

nM). Estradiol was also found to affect function of EVT *in vitro*, dose-independently inhibiting cell migration and invasion.

Analysis of placental galectin-1 confirmed that this protein retained structural, lectin and immunogenic properties. Multiple molecular forms of placental galectin-1, some of corresponding to oxidized and reduced galectin-1, were identified. Galectin-1 could be determined using an ELISA assay, based on polyclonal antibodies produced in rabbit immunized with placental galectin-1. Initial results indicated that galectin-1 could be used as biomarker in certain pathological conditions.

Key words: galectin, trophoblast, HTR-8/SVneo cells, steroid hormone, regulation, expression, secretion, placental galectin-1, ELISA

Scientific field: Pharmacy

Special topic: Medical Biochemistry

UDC number: 577.17.5/.6:577.112:57.085.2(043.3)

Skraćenice

2-ME – 2-merkaptetanol

A – adenin

ABC – kompleks avidin-biotin peroksidaza

ANOVA – analiza varijanse

ASF – asijalofetuin

At/HRPO – antitelo konjugovano peroksidazom iz korena rena

BeWo – humana horiokarcinomska ćelijska linija

BSA – goveđi serumski albumin

C – citozin

cDNK – komplementarni lanac dezoksiribonukleinske kiseline

CFA – kompletni Freund-ov adjuvans

Col – kolagen

CRD – domen koji vezuje β -galaktozidnu strukturu ugljenih hidrata (engl. *carbohydrate recognition domain*)

CTB – citotrofoblast

CYP – oznaka za pripadnike familije citohrom P450 hemproteina

CYP17A1 – 17α -hidroksilaza/17,20 liaza/17,20 dezmolaza

CYP19 – aromataza

DAB – 3,3'-diaminobenzidin

DEX – deksametazon

DHEA – dehidroepiandrosteron

DHEAS – dehidroepiandrosteron sulfat

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DTT – ditionitritol

E₂ – estradiol, 17β -estradiol

ECM – ekstracelularni matriks

EDTA – etilendiaminotetrasirćetna kiselina

EDTA-MEPBS – fosfatni pufer sa dodatkom etilendiaminotetrasirćetne kiseline i 2-merkaptetanola

egEVT – endoglandularni ekstravilusni trofoblast

ELISA - enzimski imunosorbent test (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ER – estrogenski receptor, receptor za estrogene
ERE – sekvenca u promotoru gena za koju se vezuje kompleks estrogenski receptor/ligand (engl. *estrogen response element*)
evEVT – endovaskularni ekstravilusni trofoblast
EVT – ekstravilusni trofoblast
F – flutamid
FCS – fetalni teleći serum
G – guanin
Gal – galaktoza
GalNAc – N-acetilgalaktozamin
Gly – glicin
GR – glukokortikoidni receptor
GRE – sekvenca u promotoru gena za koju se vezuje kompleks glukokortikoidni receptor/ligand (engl. *glucocorticoid response element*)
h – sat
hCG – humani horionski gonadotropin
HELLP sindrom – sindrom koji se javlja tokom trudnoće i karakteriše se hemolizom, povećanom aktivnošću enzima jetre i niskim brojem trombocita (engl. *Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low platelet count*)
HMGCoA reduktaza – 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA reduktaza
HRE – sekvenca u promotoru gena za koju se vezuje kompleks steroidni receptor/ligand (engl. *hormone response element*)
HRPO – peroksidaza iz korena rena (lat. *Armoracia rusticana*)
HSD – hidrosisteroid dehidrogenaza
HTR-8/SVneo – humana ekstravilusna trofoblastna ćelijska linija
I – ICI-182 780, fulvestrant
IgG – imunoglobulin G klase
IMAC30 – metal-afinitetni protein čip (eng. *Imobilized Metal Affinity Chromatography ProteinChip*)
iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina
IVF – postupak vantelesne oplodnje (engl. *in vitro fertilisation*)
JAR – humana horiokarcinomska ćelijska linija

JEG-3 – humana horiokarcinomska ćelijska linija
K – kontrola
Lac – laktoza
LacNAc – N-acetilaktozamin
LDL-receptor – receptor za lipoproteine male gustine (engl. *low density lipoprotein receptor*)
LGALS1 – gen koji kodira galektin-1 (engl. *lectin, galactoside-binding, soluble, 1*)
LGALS3 – gen koji kodira galektin-3 (engl. *lectin, galactoside-binding, soluble, 3*)
LGALS8 – gen koji kodira galektin-8 (engl. *lectin, galactoside-binding, soluble, 8*)
LN – laminin
min – minut
MG – *Myasthenia gravis*
MMP – matriksna metaloproteinaza
MS – masena spektrometrija
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
MUC1 – mucin 1
NAD(P)H – redukovani nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)
NeuAc – sijalinska kiselina
NP20 – protein čip sa normalnom fazom (engl. *Normal Phase ProteinChip*)
NSB – nespecifično vezivanje
onfFN – onkofetalni fibronektin
sFN – serumski fibronektin
Ox-rhgal-1 – oksidovani rekombinantni humani galektin-1
P₄ – progesteron
P450scc – holesterol monooksigenaza
PAGE – poliakrilamidna gel elektroforeza
PAI – inhibitor aktivatora plazminogena
PBS – fosfatni pufer
PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)
PMSF – fenilmetilsulfonyl fluorid
PR – progesteronski receptor

PS20 – protein čip sa preaktiviranom površinom (engl. *Preactivated Surface ProteinChip*)

rhgal-1 – rekombinantni humani galektin-1

RIA – radioimunotest (engl. *radioimmunoassay*)

RPMI 1640 – osnovni medijum za gajenje HTR-8/SVneo ćelija (engl. *Roswell Park Memorial Institute 1640*)

RT-PCR – reverzna transkripcija sa lančanom reakcijom polimeraze (eng. *reverse transcription-polymerase chain reaction*)

RU486 – mifepriston

SDS – natrijum dodecilsulfat

SDS-PAGE – natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza

s – sekunda

SELDI – površinski poboljšana desorpcija i jonizacija laserom (engl. *surface-enhanced laser desorption and ionization*)

SPA – sinapinska kiselina, 3,5-dimetoksi-4-hidroksicinaminska kiselina

STB – sinciotrofoblast

T – timin

t – vreme

TE - testosteron

TIMP – tkivni inhibitor matriksnih metaloproteinaza

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

TOF – vreme preleta (eng. *time-of-flight*)

uNK – ćelije „prirodne ubice” uterusa (engl. *uterine natural killer cells*)

uPA – urokinaza plazminogen aktivator

uPAR – ćelijski receptor za urokinaza plazminogen aktivator

VTB – vilusni trofoblast

SADRŽAJ

Uvod	1
1.1. Galektini	2
1.1.1. Osnovne karakteristike galektina.....	2
1.1.2. Strukturne karakteristike galektina.....	5
1.1.3. Oslobođanje galektina van ćelije	7
1.1.4. Biološki značaj galektina-1, -3 i 8.....	8
1.2. Galektini i reprodukcija.....	8
1.2.1. Humana placenta i trofoblast.....	8
1.2.1.1. Implantacija	8
1.2.1.2. Diferencijacija trofoblasta	10
1.2.1.2.1. Vilusni citotrofoblast	11
1.2.1.2.2. Ekstravilusni trofoblast i invazija trofoblasta.....	11
1.2.2. Distribucija galektina tokom trudnoće u zoni interakcije majke i fetusa	14
1.2.2.1. Galektini u endometrijumu.....	14
1.2.2.2. Galektini u trofoblastu i placenti	15
1.2.3. Funkcionalni značaj galektina tokom reprodukcije.....	16
1.3. Regulacija ekspresije galektina	19
1.3.1. Steroid-regulatorne sekvence u promotorima gena za galektine-1, -3 i -8.....	20
1.3.2. Steroidni hormoni i trudnoća.....	21
1.3.2.1. Sinteza steroidnih hormona tokom trudnoće	21
1.3.2.1.1. Sinteza progesterona.....	24
1.3.2.1.2. Sinteza estrogena	25
1.3.2.2. Distribucija receptora za steroidne hormone u placenti	26
1.3.2.3. Uloga progesterona i estrogena u decidualizaciji, implantaciji i placenciji ...	28
1.3.2.4. Značaj glukokortikoida u placenti	30
1.3.3. Uticaj steroidnih hormona na galektine u trofoblastu i placenti.....	32
Ciljevi	34
Materijal i metode.....	36
3.1. Kultura ćelija	37
3.1.1. Postupak uklanjanja endogenih steroida iz FCS.....	38
3.1.2. Tretman HTR-8/SVneo ćelija steroidnim hormonima i antagonistima.....	38

3.2. Određivanje koncentracije steroidnih hormona radioimunotestom (RIA).....	39
3.3. Antitela	39
3.4. Analiza ekspresije gena za galektine-1, -3 i -8 u HTR-8/SVneo ćelijama.....	40
3.4.1. Postupak izolovanja RNK	40
3.4.2. Sinteza cDNK.....	40
3.4.3. Kvantitativna PCR analiza (<i>real-time PCR</i>).....	41
3.5. SDS-PAGE i Western blot	42
3.6. SELDI-TOF masena spektrometrija.....	43
3.7. Funkcionalni <i>in vitro</i> testovi.....	46
3.7.1. Test ćelijske vijabilnosti.....	46
3.7.2. Test ćelijske migracije.....	47
3.7.3. Test ćelijske invazije	47
3.8. Izolovanje galektina-1 iz placente trećeg trimestra	48
3.8.1. Priprema placentnog ekstrakta.....	48
3.8.2. Afinitetna hromatografija i izolovanje galektina-1	49
3.8.3. Karakterizacija izolovanog galektina-1	50
3.8.3.1. Dot-imunoblot	50
3.8.3.2. SDS-PAGE na gradijentu gela i bojenje gela srebrom.....	50
3.8.3.3. Ispitivanje lektinskih svojstava izolovanog galektina-1	50
3.8.3.3.1. Test hemaglutinacije.....	50
3.8.3.3.2. Lektinski test na čvrstoj fazi.....	51
3.9. Priprema poliklonskih antitela prema galektinu-1.....	53
3.9.1. Postupak imunizacije kunića	53
3.9.2. Dvostruka imunodifuzija u gelu	53
3.9.3. Izdvajanje antitela kaprilnom kiselinom	53
3.9.4. Karakterizacija dobijenih antitela prema galektinu-1.....	54
3.9.5. ELISA test za određivanje galektina-1	54
3.9.5.1. Obeležavanje antitela peroksidazom	54
3.9.5.2. Imobilizacija antitela za polistirensku ploču	55
3.9.5.3. Određivanje koncentracije galektina-1 u humanom serumu	55
3.10. Statistička analiza	56
Rezultati.....	57

4.1. Steroidni hormoni i ekstravilusni trofoblast	58
4.1.1. Uticaj steroidnih hormona i antagonista na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija	58
4.1.2. Efekat steroidnih hormona na ekspresiju i sekreciju galektina u trofoblastu <i>in vitro</i>	59
4.1.2.1. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na ekspresiju gena za galektin-1, -3 i -8 (<i>LGALS1</i> , <i>LGALS3</i> i <i>LGALS8</i>) u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo.....	60
4.1.2.1.1. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na ekspresiju gena za galektin-1 (<i>LGALS1</i>) u HTR-8/SVneo ćelijama.....	60
4.1.2.1.2. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na ekspresiju gena za galektin-3 (<i>LGALS3</i>) u HTR-8/SVneo ćelijama.....	62
4.1.2.1.3. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na ekspresiju gena za galektin-8 (<i>LGALS8</i>) u HTR-8/SVneo ćelijama.....	63
4.1.2.1.4. Uporedna analiza efekta E ₂ na ekspresiju <i>LGALS1</i> , 3 i 8.....	64
4.1.2.2. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na nivo proteina galektina-1, -3 i -8 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo	64
4.1.2.2.1 Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na nivo proteina galektina-1 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo.....	64
4.1.2.2.2 Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na nivo proteina galektina-3 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo	66
4.1.2.2.3. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na nivo proteina galektina-8 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo.....	67
4.1.2.3. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na sekreciju galektina-1, -3 i -8 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo.....	68
4.1.2.3.1. Sekretorni profil galektina HTR-8/SVneo ćelija.....	68
4.1.2.3.2. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na sekreciju galektina-1 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo.....	70
4.1.2.3.3. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na sekreciju galektina-3 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo.....	73
4.1.2.3.4. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na sekreciju galektina-8 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo.....	74

4.1.3. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na funkcionalna svojstva trofoblasta	75
4.1.3.1. Test ćelijske migracije	75
4.1.3.2. Test ćelijske invazije	77
4.2. Galektin-1 iz placente trećeg trimestra: izolovanje i karakterizacija	78
4.2.1. Biohemijska karakterizacija placentnog galektina-1	78
4.2.2. Ispitivanje lektinske aktivnosti placentnog galektina-1	82
4.3. Prečišćavanje i karakterizacija poliklonskih antitela prema galektinu-1	84
4.3.1. Reaktivnost dobijenog kunićevog antiseruma	84
4.3.2. Karakterizacija poliklonskih antitela prema galektinu-1	85
4.3.4. Ispitivanje dijagnostičkog značaja galektina-1: galektin-1 kao biomarker	88
Diskusija	89
Zaključci	103
Literatura	105
Prilozi	130

Uvod

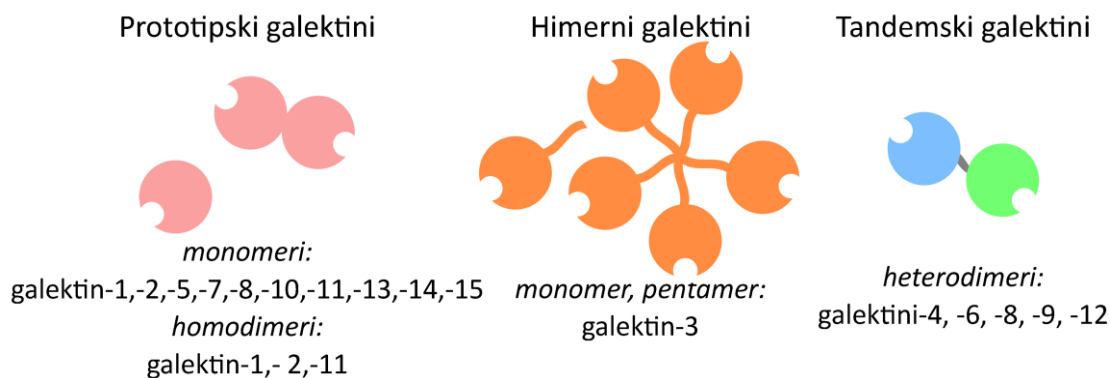
1.1. Galektini

1.1.1. Osnovne karakteristike galektina

Galektini su evolutivno očuvana grupa animalnih lektina [Barondes i sar., 1994a; Hirabayashi i Kasai, 1998; Than i sar., 2008c]. Zastupljeni su kod mnogih organizama, od sunđera do čoveka, što ukazuje na njihov značaj [Kasai i Hirabayashi, 1996]. Karakterišu se prisustvom konsenzus sekvence u domenu koji vezuje ugljene hidrate (*carbohydrate recognition domain* - CRD) i afinitetom prema β -galaktozidnoj strukturi [Barondes i sar., 1994a]. Sposobnost vezivanja ugljenih hidrata ove grupe lektina nije zavisna od prisustva metalnih jona, ali većina galektina zahteva redukujuće uslove da bi ispoljila lektinska svojstva [Hirabayashi i Kasai, 1993; Leffler i sar., 2004]. Iako poseduju mesto za potencijalnu glikozilaciju, galektini nisu glikozilovani, dok je N-terminus obično acetilovan [Barondes i sar., 1994b].

Do danas je kod čoveka opisano 13 galektina [Than i sar., 2014]. Prema usvojenoj nomenklaturi, galektini sisara su označeni brojevima, prema redosledu otkrivanja, dok se galektini nižih organizama označavaju specifičnim imenima [Hirabayashi i Kasai, 1993]. Prema strukturi CRD, galektini sisara su podeljeni u tri grupe (Slika 1) [Hirabayashi i Kasai, 1993]:

- prototipski galektini imaju jedan CRD i mogu postojati kao monomeri ili formiraju homodimere
- himerni tip – jedini himerni galektin je galektin-3, koji pored CRD poseduje i nelektinski N-terminalni kraj, odgovoran za formiranje oligomera, čime se povećava mogućnost umrežavanja glikokonjugata
- tandemski galektini koji su sastavljeni od dva različita CRD, spojena kratkom sekvencom, bogatom aminokiselinama prolin i glicin.



Slika 1. Podela galektina prema strukturi.

Afinitet vezivanja CRD galektina za laktozu (Lac) i N-acetilaktozamin (LacNAc) je relativno nizak, ali je znatno veći za linearne polilaktozaminske lance smeštene na krajevima ugljenohidratnih lanaca glikokonjugata. Osnovni ligand koga prepoznaju CRD galektina *in vivo* je LacNAc koji može imati β 1-4 (tip I) ili β 1-3 (tip II) glikozidnu vezu. Pored toga, galektini-1 i -3 prepoznaju i β 1-3 glikozidnu vezu u Thomsen-Friedenreich antigenu (TF antigen, Gal β 1-3GalNAc struktura) eksprimiranom na mucinu 1 (MUC1), ali i na drugim glikoproteinima [Hanisch i Baldus, 1997].

Unutar CRD nalazi se osam aminokiselina koje određuju specifičnost vezivanja šećerne komponente i ključne su za interakciju sa glikokonjugatima. Zamena neke od ovih aminokiselina ili menja selektivnost prema određenom šećeru ili dovodi do gubitka lektinske aktivnosti [Hirabayashi i Kasai, 1991]. Pored zajedničkog afiniteta prema β -galaktozidnim strukturama, razlike u strukturi CRD pojedinih galektina omogućavaju finu specifičnost prema određenim tipovima šećera što, u funkcionalnom smislu, omogućava interakciju različitih galektina sa različitim glikokonjugatima (Tabela I) [Carlsson i sar., 2012; Stowell i sar., 2008].

Četiri žljeba, A, B, C i D, čine CRD. Žljeb C je definisan kao mesto vezivanja galaktoze, dok dužina preostala tri varira i daje svakom od galektina mogućnost posedovanja različite fine specifičnosti [Salomonsson i sar., 2010]. Tako, kod galektina-1 i -3 terminalni LacNAc glikana se vezuje za C-D žljebove. Međutim, ukoliko je za glukozu LacNAc vezana sijalinska kiselina α 2,6 vezom (NeuAc α 2,6), vezivanje galektina-1 će biti potpuno blokirano, jer se NeuAc α 2,6 smešta u žljeb B [Salomonsson i sar., 2010]. Vezivanje galektina-3 za α 2,6-sijalo-glikane zavisi od dužine LacNAc niza

– galektin-3 će se vezati za glikane kod kojih je α 2,6-sijalinizacija unutar polilaktozaminskih lanaca, ali ne i za one koji sadrže samo jednu terminalnu NeuAc α 2,6 [Stowell i sar., 2008]. S druge strane, prisustvo NeuAc α 2,3 ne blokira vezivanje galektina-1 ili -3 za glikane [Stowell i sar., 2008].

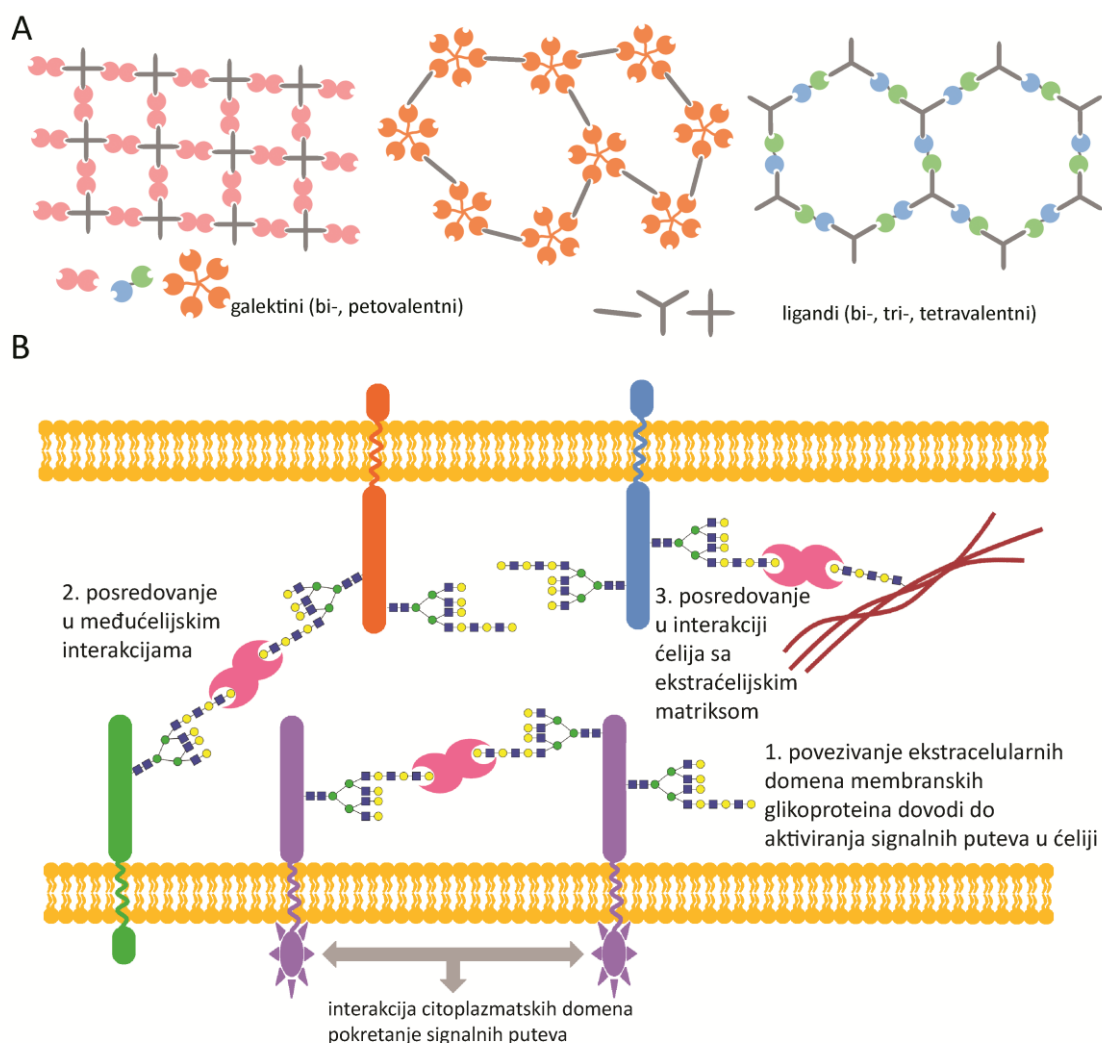
Tabela I Ugljenohidratna specifičnost galektina-1, -3, -8 (modifikovano prema Rabinovich i Toscano, 2009).

Galektin	Ugljenohidratna specifičnost galektina-1, -3 i -8
Galektin-1	<p>Visok afinitet prema kompleksnim N-glikanima (tri>bi>mono)</p> <p>Vezuje se za neredukujuće krajnje LacNAc</p> <p>Sijalinska kiselina u položaju α2,6 blokira vezivanje</p> <p>3-O-sulfatacija pospešuje vezivanje</p>
Galektin-3	<p>Vezuje se za neredukujuće krajnje i unutrašnje LacNAc</p> <p>Afinitet raste sa povećanjem LacNAc jedinica</p> <p>Vezuje se za α2,6-sijalo poli-LacNAc</p> <p>3-O-sulfatacija pospešuje vezivanje</p> <p>Visok afinitet prema A i B antigenima krvnih grupa</p>
Galektin-8	<p>3-O-sulfatacija i α2,3-sijalinizacija povećavaju afinitet</p> <p>Prvenstveno prepoznaje B antigen krvnih grupa</p> <p>Vezivuje se za glikosfingolipide (GM3, DG1a)</p>

● Glukoza ■ N-acetilglukozamin ● Galaktoza ■ N-acetilgalaktozamin ● Manozna ▲ Fukoza ◆ Sijalinska kiselina
 H-β³-Gal H-β⁴-Gal LacNAc tip 1 LacNAc tip 2 ○ β-galaktozid struktura glikokonjugata

Afinitet galektina za vezivanje glikokonjugata povećava se formiranjem dimera i oligomera. Spособnost umrežavanja glikokonjugata na površini ćelije i u ekstracelularnom matriksu (ECM) predstavlja osnovu za vanćelijsko delovanje galektina [Cummings i Liu, 2009]. Dimerni i oligomerni galektini mogu vezati iste ili različite glikoligande, što je posebno izraženo kod tandemskih galektina koji imaju dva različita CRD. Postoji nekoliko načina (Slika 2) putem kojih galektini umrežavaju

glikokonjugate, u zavisnosti od strukture galektina, odnosno glikokonjugata [Rabinovich i Toscano, 2009].

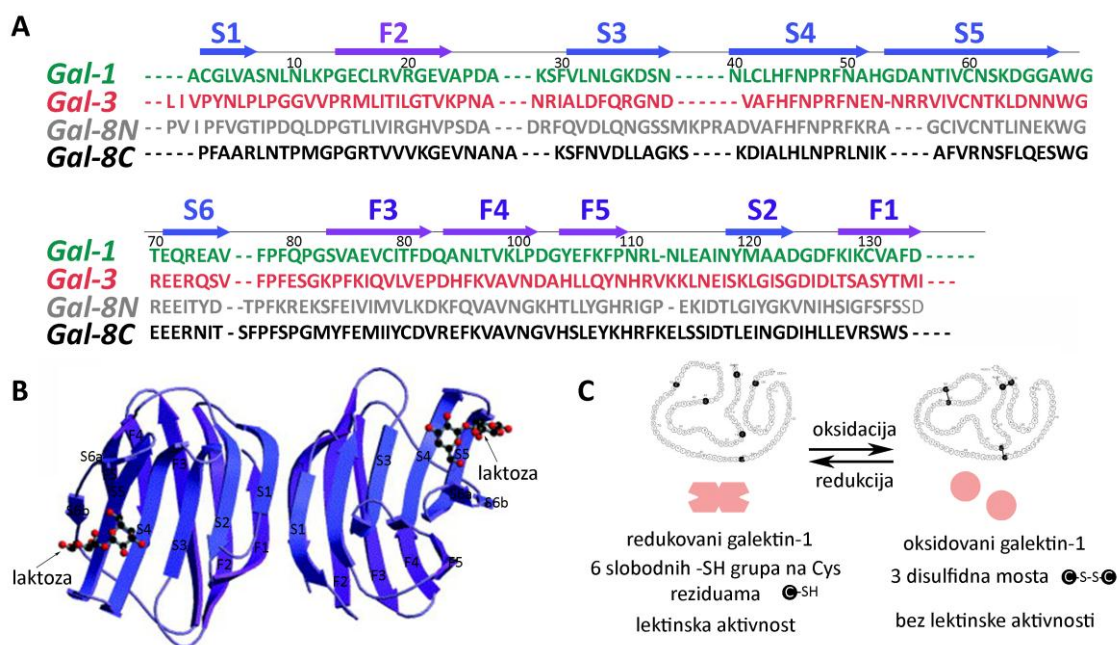


Slika 2. Posredovanje galektina u umrežavanju glikokonjugata. A) Šema struktura rešetki koje galektini formiraju sa glikokonjugatima (modifikovano prema Rabinovich i Toscano, 2009). B) Biološki značaj vanćelijskih interakcija galektina sa glikoproteinima na površini ćelije i glikoproteinima ECM (modifikovano prema Cummings i Liu, 2009).

1.1.2. Strukturne karakteristike galektina

Postoji visok stepen homologije aminokiselinske sekvence unutar CRD različitih galektina, pa samim tim i velika sličnost u terciarnoj strukturi njihovih CRD (Slika 3) [Guardia i sar., 2014]. Strukturnu organizaciju CRD galektina (Slika 3) čine dve

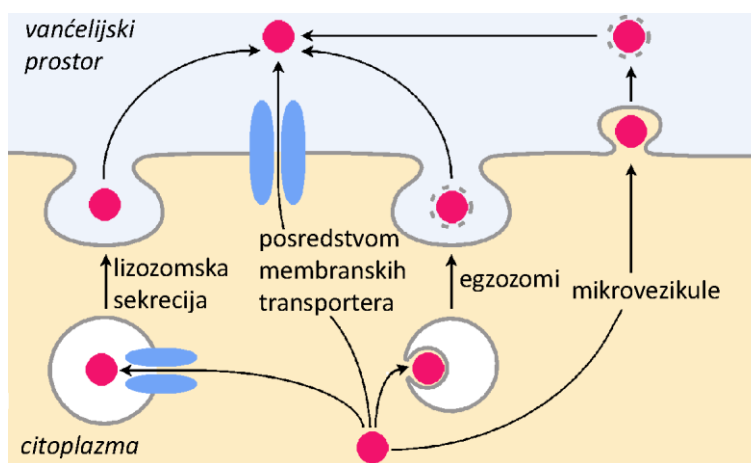
antiparalelne β -nabrane ploče, jedna sastavljena od pet (F1-F5) i druga od šest (S1-S6) lanaca [Barondes i sar., 1994a; Cho i Cummings, 1995a]. Monomerni galektini, kakav je galektin-1, pri visokim koncentracijama formiraju nekovalentni homodimer [Cho i Cummings, 1995a]. Subjedinice su povezane hidrofobnim i vodoničnim vezama, pri čemu su glikan-vezujuća mesta locirana na suprotnim krajevima [Lopez-Lucendo i sar., 2004]. Pri niskim koncentracijama, dimer spontano disocira na monomernu subjedinicu [Cho i Cummings, 1995a]. U nereducujućim uslovima, unutar CRD se uspostavljaju disulfidne veze koje dovode do disocijacije homodimera i gubitka lektinske aktivnosti [Kadoya i Horie, 2005; Lopez-Lucendo i sar., 2004].



Slika 3. Struktura galektina-1. A) Poravnanje aminokiselinskih sekvenci CRD galektina-1 i -3 i N- i C-CRD heterodimera galektina-8 (modifikovano prema Guardia i sar., 2014). B) Šematski prikaz homodimerne strukture galektina-1 – organizacija β -nabranih ploča i položaj vezivanja laktoze (modifikovano prema Lopez-Lucendo i sar., 2004). C) Uticaj redukujućeg agensa na strukturu, dimerizaciju i lektinsku aktivnost galektina-1 (modifikovano prema Kadoya i Horie, 2005).

1.1.3. Oslobađanje galektina van ćelije

Galektini poseduju karakteristike citoplazmatskih proteina: sintetišu se na ribozomima u citoplazmi i ne poseduju signalnu sekvencu karakterističnu za proteine koji se sekretuju iz ćelije [Hughes, 1999]. Ipak, galektini su u značajnoj meri prisutni van ćelije, na spoljašnjoj strani ćelijske membrane, kao i u ECM. Njihovo oslobađanje iz ćelije se odvija neklasičnim putem sekrecije, potpuno nezavisno od uobičajenog prolaska proteina kroz endoplazmatski retikulum i Goldži kompleks [Nickel, 2005; Sato i sar., 1993]. Predloženo je nekoliko alternativnih načina za eksport galektina van ćelije (Slika 4). Pokazano je da je interakcija galektina-1 sa odgovarajućim glikopartnerima potrebna za njegovo sekretovanje: odsustvo β -galaktozid struktura na glikoproteinima ili gubitak lektinske aktivnosti galektina-1 (mutantna forma) dovode gotovo do zaustavljanja oslobađanja galektina iz ćelije [Cho i Cummings, 1995b; Seelenmeyer i sar., 2005]. Pored ovog, sekrecija galektina-1 moguća je i posredstvom vezikularnog transporta [Atay i sar., 2011; Cooper i Barondes, 1990; Welton i sar., 2010]. Takođe, pokazano je da postoji i mogućnost da galektini direktno penetriraju kroz lipidni dvosloj [Lukyanov i sar., 2005].



Slika 4. Pretpostavljeni putevi sekrecije galektina (modifikovano prema Nickel, 2005).

1.1.4. Biološki značaj galektina-1, -3 i 8

Galektini su multifunkcionalni proteini. Svoje brojne biološke funkcije ostvaruju unutar i van ćelije [Camby i sar., 2006]. Unutarćelijske uloge galektina uglavnom su zasnovane na protein-protein interakcijama, dok vanćelijske uglavnom zavise od njihove lektinske aktivnosti i sposobnosti galektina da dimerizuju/oligomerizuju i umrežavaju glikokonjugate na površini ćelije ili u ECM [Hsu i Liu, 2002]. Galektini imaju brojne uloge, a mnoge od njih se odnose na vitalne procese u ćeliji [Compagno i sar., 2014; Elola i sar., 2007].

1.2. Galektini i reprodukcija

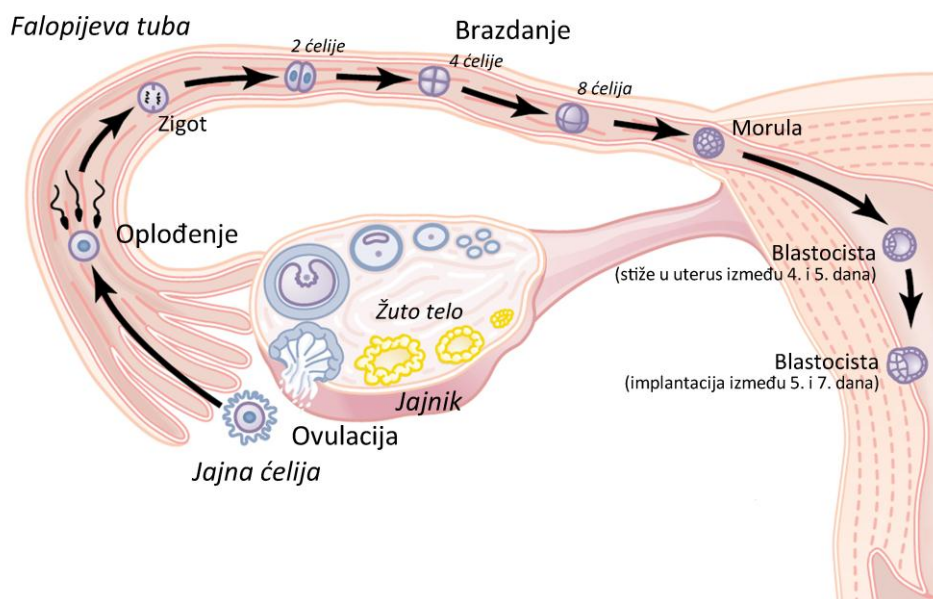
Galektin-1 poreklom iz humane placente je prvi galektin izolovan i biohemijski okarakterisan kod čoveka [Hirabayashi i Kasai, 1984]. Pored galektina-1, u reproduktivnom traktu žene su nađeni gotovo svi galektini čoveka. Neki od njih su eksprimirani u preimplantacionom embrionu i u placenti, a za neke je pokazana i uloga u uslovima *in vitro*, pa je pretpostavljeno da je uloga galektina u reprodukciji čoveka vrlo bitna [Barrientos i sar., 2014; Kolundzic i sar., 2011a; Than i sar., 2012; Tirado-Gonzalez i sar., 2013].

1.2.1. Humana placenta i trofoblast

1.2.1.1. Implantacija

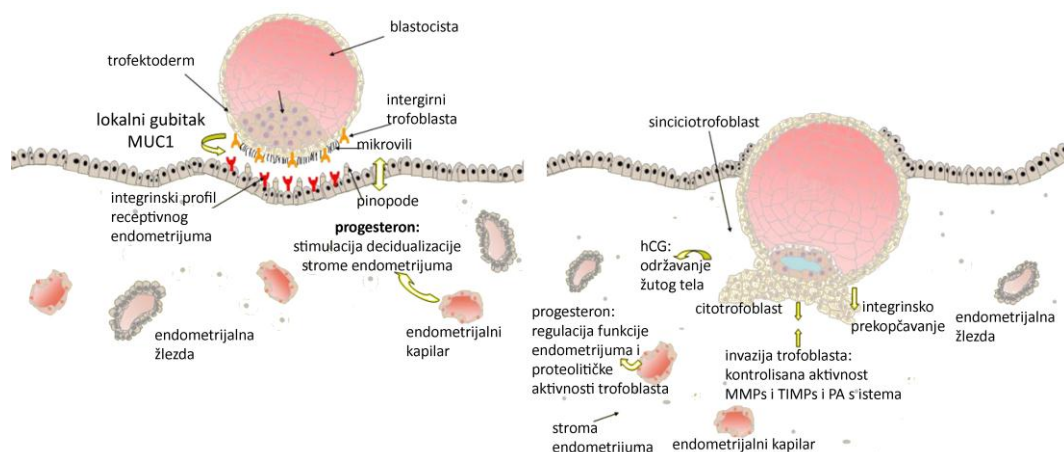
Implantacija humanog embriona predstavlja inicijalno spajanje i uranjanje blastociste u decidualno izmenjen endometrijum [Benirschke i sar., 2012]. Implantacija je moguća samo tokom kratkog perioda sredinom luteinske faze menstrualnog ciklusa - receptivne faze [Carson i sar., 2000]. Oplođenje (fertilizacija) jajne ćelije odvija se u jajovodu 24-48 sati nakon ovulacije. Sukcesivnim deobama (brazdanjem) oplođene jajne ćelije (zigota) nastaje morula, koja je obavijena zaštitnim, neadhezivnim omotačem (*zona pellucida*). Brazdanje se odvija paralelno sa promenama u endometrijumu. Da bi implantacija bila uspešna, endometrijum i blastocista moraju biti sinhronizovani, odnosno kada je „implantacioni prozor otvoren“, blastocista treba da je spremna za implantaciju [Denker, 1993]. Stadijum blastociste je prvi stadijum u kome počinje diferenciranje ćelija. Blastocistu čine centralna šupljina ispunjena tečnošću

(blastocel), spoljašnji sloj trofektoderma i unutrašnja ćelijska masa (embrioblast). Od trofektoderma nastaje placenta, a unutrašnja ćelijska masa se razvija u embrion. U šupljini uterusa, blastocista se oslobađa iz *zone pellucide* i usađuje se (implantira) u zid uterusa, najčešće u zoni fundusa uterusa, 6-7 dana nakon oplodjenja jajne ćelije, odnosno 7-11 dana nakon ovulacije (Slika 5) [Guyton i Hall, 2006].



Slika 5. Razvoj embriona tokom prve nedelje (modifikovano prema Guyton i Hall, 2006).

Implantacija blastociste odvija se u tri koraka [Boyd i Hamilton, 1970; Norwitz i sar., 2001]. Tokom prve faze, apozicije, uspostavlja se labilni kontakt između endometrijuma i blastociste, čija je unutrašnja ćelijska masa (embrionalni pol) okrenuta ka endometrijumu. U drugom koraku, adheziji, ćelije luminalnog epitela endometrijuma pružaju pinopode, koje se prepliću sa mikrovilima na apikalnoj površini blastociste. Adhezija predstavlja uspostavljanje jače interakcije između embriona i uterusa. Najzad nastupa penetracija embriona u zid uterusa. Do 10. dana od oplodnje, blastocista je u potpunosti uronjena u stromu uterusa (Slika 6).



Slika 6. Šematski prikaz implantacije blastociste u endometrijum (modifikovano prema Staun-Ram i Shalev, 2005).

Kako su galektini prisutni i u endometriju i u trofektodermu blastociste, a kasnije i u trofoblastu i placenti, saznanja o njihovoj ulozi i regulaciji tokom trudnoće pomogla bi u boljem razumevanju mehanizama koji regulišu proces implantacije i doprinela rešavanju problema neuspešne implantacije i ranog gubitka ploda.

1.2.1.2. Diferencijacija trofoblasta

Prilikom implantacije započinje razvoj placente, koji se naziva placentacija. Placentu u funkcionalnom smislu, pre svega, čine ćelije trofoblasta, koje potiču od trofektoderma, spoljašnjeg jednoćelijskog sloja blastociste. Osnovnu funkcionalnu jedinicu placente predstavljaju horionske resice, čija je površina prekrivena trofoblastnim dvoslojem koji čine sinciotrofoblast (STB) i citotrofoblast (CTB) [Benirschke i sar., 2012; Loke i King, 1995; Norwitz i sar., 2001]. Ove dve grupe ćelija, iako se međusobno razlikuju, označavaju se zajedničkim imenom trofoblast. Citotrofoblastne ćelije predstavljaju elemente iz kojih se diferenciraju različite subpopulacije trofoblasta. Diferencijacija trofoblasta je ključna za razvoj placente i njenu funkciju [Red-Horse i sar., 2004]. Tokom placentacije, ćelije CTB diferenciraju u dva morfološki i funkcionalno različita fenotipa: vilusni (VTB) i ekstravilusni trofoblast (EVT) [Benirschke i sar., 2012]. Budući da su fetalnog porekla, ćelije trofoblasta predstavljaju semialograft, i dolaze u kontakt sa krvlju majke i različitim imunskim ćelijama, sa kojima interaguju na specifičan način koji obezbeđuje preživljavanje fetalnog semialografta [Moffett i Loke, 2006].

1.2.1.2.1. Vilusni citotrofoblast

Vilusni CTB formira plivajuće resice, koje su okružene krvlju majke i nisu u kontaktu sa zidom uterusa. Fuzijom ćelija CTB plivajućih resica formira se višejedarni sincicijum koji prepokriva površinu vilusnog stabla, horionske i bazalne ploče. Tokom trudnoće, sincicijum se kontinuirano obnavlja iz sloja ćelija CTB koje se nalaze ispod sincicijuma [Kar i sar., 2007]. Sincicijum predstavlja višejedarnu strukturu, tako da prisustvo višesutrukih kopija gena omogućava istovremeno obavljanje različitih funkcija. Sincicotrofoblast sintetiše steroidne i peptidne hormone, kao i brojne faktore rasta [Albrecht i Pepe, 1990]. Pored endokrine uloge, STB vrši razmenu gasova i hranljivih materija između majke i fetusa, odnosno uklanjanje otpadnih materija fetusa.

1.2.1.2.2. Ekstravilusni trofoblast i invazija trofoblata

Ekstravilusni CTB ispoljava veoma invazivni fenotip i učestvuje u formiranju sidrećih resica, koje fizički pričvršćuju placentu za zid uterusa. Ekstravilusnu ćelijsku populaciju čine ćelijska ostrva, citotrofoblastna ljuska i ćelijski stubovi, endovaskularni, endoglandularni i intersticijalni trofoblast. Citotrofoblastne ćelije na bazalnoj membrani ispoljavaju epitelni fenotip, polarizovane su i intenzivno proliferišu [Aplin, 1993]. Dve nedelje nakon implantacije, pod uticajem decidualnih faktora, citotrofoblastne ćelije se odvajaju od bazalne membrane i probijaju sincicijum koji prepokriva površinu resice [Vicovac i Aplin, 1996]. Ćelije postaju nepolarizovane, grupišu se i formiraju ćelijske stubove, koji se pružaju ka placentnom ležištu i uspostavljaju kontakt sa uterusom majke. Tokom ekstravilusnog puta diferencijacije, od pretežno adhezivnih ćelija postepeno nastaju ćelije sa dominantno invazivnim sposobnostima. Tako se duž ćelijskog stuba razlikuje nekoliko zona, sa CTB ćelijama različitih karakteristika (Slika 7) [Damsky i sar., 1992].

Integrini, transmembranski glikoproteinski receptori, omogućavaju vezivanje između ćelija i za komponente ECM, čime posreduju u procesima adhezije [Bowen i Hunt, 2000]. Kombinacija α i β subjedinica u heterodimernom kompleksu integrina određuje specifičnost prema ligandu [Bowen i sar., 1996]. Tokom napredovanja invazivnog trofoblata kroz deciduu, različite grupe ćelija trofoblata ispoljavaju različite integrine na svojoj površini – integrinsko prekopčavanje [Damsky i sar., 1994]. Diferencijacija trofoblata ka ekstravilusnom fenotipu i napredovanje ćelija EVT prema

decidui odlikuju se povećavanjem ekspresije $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$ i $\alpha V\beta 1$ integrina, uz istovremeni gubitak ekspresija integrina $\alpha 6\beta 4$ [Aplin, 1993; Damsky i sar., 1992]. [Zhou i sar., 1997]. Pored toga, intersticijalni i endovaskularni CTB ekspimiraju integrin $\alpha 1\beta 1$, receptor za laminin i kolagen [Damsky i sar., 1992]. Blokiranje interakcije integrina $\alpha 1\beta 1$ sa njegovim ligandima inhibira invaziju EVT [Damsky i sar., 1992; Damsky i sar., 1994]. Pored $\alpha 1\beta 1$ integrina, invazivni CTB takođe ekspimiraju i integrine $\alpha v\beta 3$ i $\alpha v\beta 5$ [Benirschke i sar., 2012].

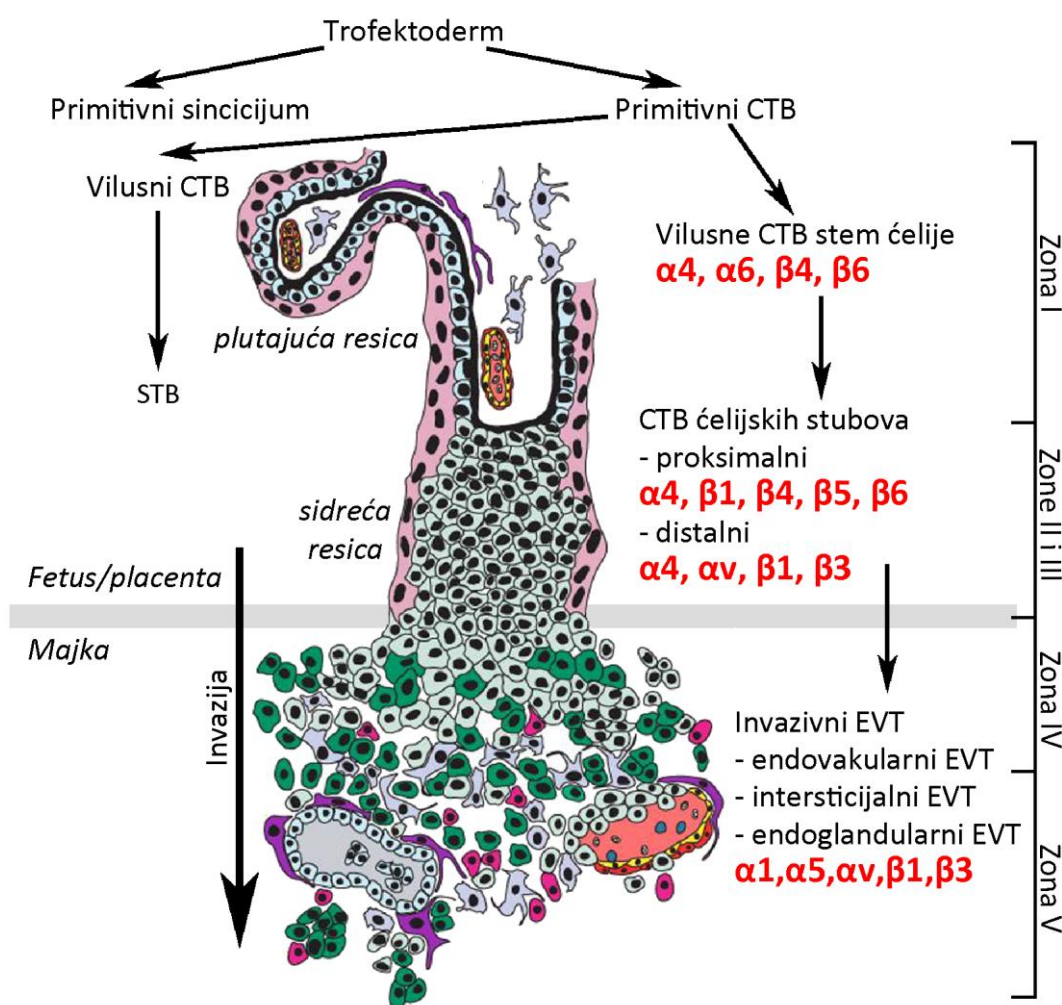
Ćelije trofoblasta tokom diferencijacije sintetišu i komponente ECM: laminin, kolagen tipa IV, fibrin, fibronektin, vitronektin i heparan-sulfat [Huppertz i sar., 1996; Kemp i sar., 2002; Vićovac i sar., 1995]. Diferencijacija i invazija trofoblasta praćene su gubitkom adhezivnih molekula, karakterističnih za CTB na bazalnoj membrani, i ekspresijom adhezivnih receptora svojstvenih vaskularnim ćelijama [Damsky i sar., 1997; Zhou i sar., 1997].

Na diferencijaciju CTB utiču, pre svega, regulatorni faktori: hormoni, citokini i faktori rasta, kao i uslovi mikrookoline (parcijalni pritisak kiseonika) [Genbacev i sar., 1997; Staun-Ram i Shalev, 2005]. Invazija trofoblasta zavisi i od sastava i strukture ECM endometrijuma [Iwahashi i sar., 1996; Kliman i Feinberg, 1990]. Tokom decidualizacije započinje reorganizacija ECM endometrijuma, koji treba da pruži mehaničku barijeru invazivnom trofoblastu. Na strukturu decidualnog ECM utiču dva bitna faktora: hormoni i remodelovanje od strane invazivnog trofoblasta [Gellersen i sar., 2007].

Invazija trofoblasta predstavlja aktivan, strogo regulisan i koordinisan proces [Kliman i Feinberg, 1990]. Proces invazije obuhvata pripajanje ćelija trofoblasta za ECM endometrijuma, njegovu degradaciju i migraciju trofoblasta kroz vezivno tkivo. Sekrecijom proteaza trofoblast omogućava degradaciju ECM. U invaziji trofoblasta učestvuju nekoliko proteaznih sistema: matriksne metaloproteinaze (MMP) i tkivni inhibitori matriksnih proteinaza (TIMP), urokinaza-tip plazminogen aktivator (uPA), njegov inhibitor (PAI) i odgovarajući ćelijski receptor (uPAR), i katepsini (B, L). Proces invazije regulisan je i brojnim hormonima, adhezivnim molekulima i hemokinima [Lunghi i sar., 2010].

Ekstravilusni trofoblast obuhvata nekoliko različitih subpopulacija ćelija (Slika 7). Ćelije endovaskularnog trofoblasta (evEVT) kolonizuju spiralne arterije endometrijuma

i unutrašnje trećine miometrijuma. Trofoblast ispoljava vaskularnu specifičnost – invadira arterije, ali ne i vene [Kliman, 2000]. Tokom endovaskularne invazije epitelne ćelije evEVT stiču endotelna svojstva i zamenjuju endotelne ćelije i mišićne subendotelne ćelije spiralnih arterija. Gubitkom mišićnog subendotela, spiralne arterije gube elastičnost i postaju niskorezistentni, visokokapacitativni krvni sudovi. Modifikacija spiralnih arterija od strane evEVT je hemodinamski najpovoljniji način prilagođavanja cirkulacije majke potrebama rastućeg fetusa i placente tokom trudnoće [Kliman, 2000].



Slika 7. Promena integrinskog profila tokom diferencijacije trofoblasta (modifikovano prema Zhou i sar., 1997).

Deo EVT koji vrši invaziju u decidualne endometrijalne žlezde je endoglandularni trofoblast (egEVT). Pokazano je da je tokom prvog trimestra lumen decidualnih žlezda u kontaktu sa intervilusnim prostorom [Burton i sar., 1999]. Invazijom u decidualne žlezde obezbeđuje se histiotrofna ishrana trofoblasta i embriona tokom prvog trimestra, kada EVT ćelije dovode do zatvaranja lumena spiralnih arterija [Burton i sar., 2007; Burton i sar., 2002].

Deo EVT završava u stromi endometrijuma, gde dolazi do njihove fuzije i stvaranja višejedarnih džinovskih ćelija placentnog trofoblastnog ležišta. Ova subpopulacija se naziva intersticijalnim trofoblastom [Ji i sar., 2013; Loke i King, 1995].

Izolovane citotrofoblastne ćelije prvog trimestra u *in vitro* uslovima zadržavaju sposobnost da migriraju, formiraju agregate i penetriraju kroz različite ECM, kao što je Matrigel® [Tarrade i sar., 2002].

1.2.2. Distribucija galektina tokom trudnoće u zoni interakcije majke i fetusa

1.2.2.1. Galektini u endometrijumu

Galektini-1 i -3 su prvi detektovani i najzastupljeniji su galektini u endometrijumu i decidui kod čoveka i eksperimentalnih životinja [Maquoi i sar., 1997; Phillips i sar., 1996]. Prisustvo galektina tokom proliferativne faze je slabo izraženo, ali je porast nivoa progesterona (P₄) od sredine menstrualnog ciklusa praćen povećanom ekspresijom galektina-1 i -3 u endometrijumu, i na genskom i na proteinskom nivou [von Wolff i sar., 2005]. Ukoliko dođe do implantacije, nivo galektina u decidui dalje raste i u značajnoj meri se održava tokom ostatka trudnoće [von Wolff i sar., 2005]. Kod žena, galektin-1 je prisutan pretežno u stromi endometrijuma i decidue početkom trudnoće [Bevan i sar., 1994; Vićovac i sar., 1998; von Wolff i sar., 2005]. Osim u ćelijama strome, galektin-1 se nalazi i u ćelijama imunskog sistema majke, uterusnim regulatornim T ćelijama i ćelijama „prirodnim ubicama” (uNK) [Garin i sar., 2007; Koopman i sar., 2003; Kopcow i sar., 2008]. Galektin-3 je karakterističan za žlezdani epitel – u žlezdama endometrijuma van trudnoće, kao i u decidualnim žlezdama [von Wolff i sar., 2005].

Pored galektina-1 i -3, u humanom endometrijumu je pokazano prisustvo i galektina-2, -4, -7, -8, -9 i -12 [Menkhorst i sar., 2014; Nikzad i sar., 2013; Popovici i

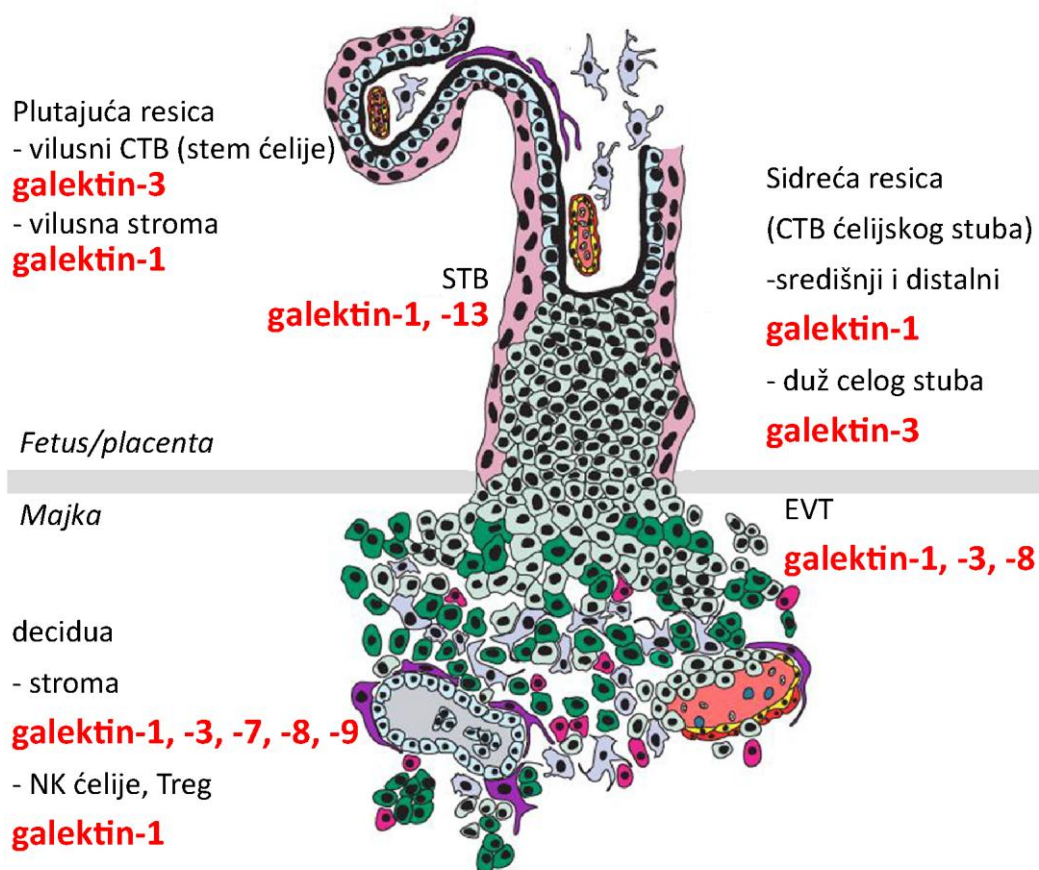
sar., 2005; von Wolff i sar., 2005]. Galektin-7 prisutan je u epitelu endometrijuma tokom kasne sekretorne faze, kao i u decidualnj stromi [Menkhorst i sar., 2014]. Tokom luteinske faze, prisustvo galektina-8 unutar uterusa pokazano je u luminalnom i žlezdanom epitelu, ali i u stromi [Nikzad i sar., 2013]. Kako je pokazano da je galektin-9 prisutan u uterusu samo tokom receptivne faze i to baš na mestu implantacije, ovaj galektin bi mogao biti relevantan za implantaciju [Popovici i sar., 2005]. Na osnovu ovih rezultata pretpostavljeno je da bi galektini-8 i -9 mogli biti markeri receptivnosti endometrijuma [Nikzad i sar., 2013; Popovici i sar., 2005]. Pretpostavlja se da galektini u endometrijumu učestvuju u održavanju homeostaze ćelija endometrijuma, štite reproduktivni trakt od mikroorganizama i modulišu imunski sistem, što je posebno značajno prilikom implantacije [Popovici i sar., 2005; von Wolff i sar., 2005].

1.2.2.2. Galektini u trofoblastu i placenti

Prisustvo galektina je veoma rano izraženo – već kod preimplantacionog embriona. Kod miša, galektin-1 i -3, kao i galektin -5, specifičan za miša, pokazani su u trofektodermu, ali ne i u embrioblastu [Colnot i sar., 1998; Poirier i sar., 1992].

Kod čoveka, galektin-1 je prisutan u trofektodermu i embrioblastu, ali se takođe i sekretuje [Tirado-Gonzalez i sar., 2013]. U placenti čoveka prvog trimestra pokazano je prisustvo proteina galektina-1, -3, -8 i -13 (Slika 8) [Kolundzic i sar., 2011b; Maquoi i sar., 1997; Than i sar., 2014; Vićovac i sar., 1998]. Imunocitohemijskim bojenjem tkiva placente prvog trimestra pokazano je prisustvo galektina-1 u središnjem i distalnom delu ćelijskog stuba, kao i u sincicijumu, ali ne i u CTB na bazalnoj membrani [Vićovac i sar., 1998]. Za razliku od galektina-1, prisustvo galektina-3 je pokazano u vilusnom CTB, ali ne i u sincicijumu [Maquoi i sar., 1997; Vićovac i sar., 1998]. Lokalizacija galektina-13 je karakteristična za STB [Kliman i sar., 2012; Than i sar., 1999].

Pored navedenih galektina u placenti čoveka trećeg trimestra pokazano i prisustvo galektina-2, -14, -16 i -17 [Hutter i sar., 2015; Than i sar., 2009; Than i sar., 2014].



Slika 8. Distribucija galektina u zoni interakcije majke i fetusa tokom prvog trimestra trudnoće (modifikovano prema Zhou i sar., 1997; Blois i Barrientos, 2014).

Različite trofoblastne ćelijske linije takođe eksprimiraju galektine [Bojić-Trbojević i sar., 2005; Božić, 2003; Vićovac i sar., 1998]. U kulturi CTB ćelija prvog trimestra i u EVT ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo pokazano je prisustvo tri člana ove familije: galektina-1, -3, i -8 [Kolundzic i sar., 2011b].

1.2.3. Funkcionalni značaj galektina tokom reprodukcije

Uloga galektina-1 u implantaciji prvobitno je ispitivana na mišjem modelu *in vivo* [Colnot i sar., 1998; Poirier i Robertson, 1993]. Studije na galektin-1 i/ili galektin-3 *knock-out* miševima pokazale su da prisustvo ovih galektina nije neophodno za preživljavanje i razmnožavanje [Colnot i sar., 1998; Poirier i Robertson, 1993]. Iako su miševi bili fertilni u odsustvu galektina-1 ili -3, uspešnost implantacije je bila manja, a stopa gubitka ploda veća kod ovih životinja u odnosu na normalni soj. Jedno od

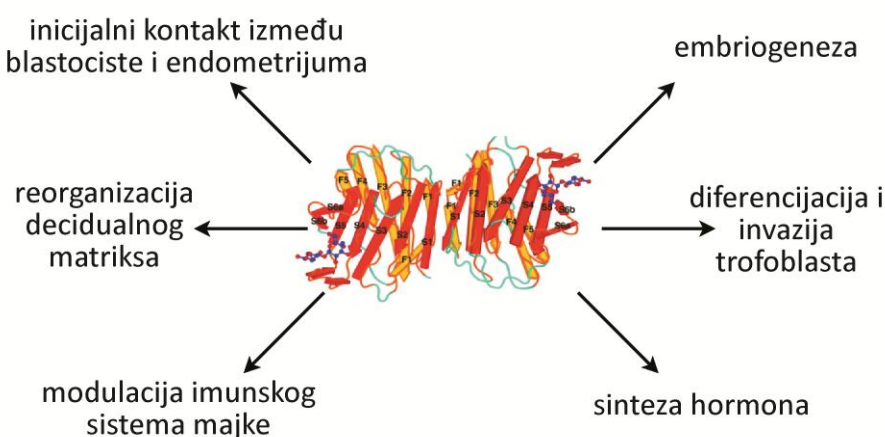
objašnjenja za uspešnost implantacije u odsustvu galektina-1 i -3 je molekularna supstitucija, odnosno mogućnost da u odsustvu jednog galektina, njegovu ulogu preuzme drugi prisutan član familije galektina. Tako je kod miševa pretpostavljeno da bi galektin-5 mogao nadomestiti nedostatak galektina-1 i -3 [Colnot i sar., 1998]. Međutim, kako su kod galektin-1 i -3 *knock-out* miševa, uočeni poremećaji u razvoju potomstva, zaključeno je da je učešće galektina-1 i -3 potrebno tokom embriogeneze [Poirier, 2002].

Galektini i njihovi ligandi, glikokonjugati, prisutni su i sa majčine (u endometrijumu) i sa fetalne (na površini trofektoderma) strane. Stoga je pretpostavljeno da bi galektini mogli učestvovati u inicijalnom raspoznavanju blastociste i endometrijuma. Na osnovu nedavnih rezultata, pretpostavljeno je da, kod čoveka, postoji mogućnost da se tokom inicijalne faze implantacije galektin-1 embrionalnog porekla vezuje za MUC1 endometrijuma [Barrientos i sar., 2014]. Pokazano je da uzajamna kompatibilnost glikokonjugata i lektina, ima značajnu ulogu u interakciji blastociste i endometrijuma i iniciranju uspešne implantacije [Jones i Aplin, 2009].

Implantacija kod miša i pacova (eksperimentalni modeli), razlikuje se u odnosu na implantaciju kod čoveka, pa posledice odsustva galektina-1 i -3 ne moraju biti iste u ovim vrstama. Funkcionalni značaj eliminacije galektina nije moguće direktno ispitati kod čoveka, ali klinički podaci ukazuju da bi galektin-1 mogao imati važnu ulogu i u implantaciji humanog embriona i održanju trudnoće. Određena patološka stanja koja se javljaju u trudnoći mogu biti posledica poremećaja u invaziji trofoblasta [Kaufmann i sar., 2003; Pollheimer i Knofler, 2012]. U skladu sa tim, i ekspresija galektina-1, za koga je pokazano da učestvuje u invaziji trofoblasta, je izmenjena u nekim poremećajima vezanim za reprodukciju [Barrientos i sar., 2014; Kolundzic i sar., 2011a]. Nivo galektina-1 u cirkulaciji žena kod kojih je rano došlo do gubitka ploda značajno je niži u odnosu na normalno fertile žene [Ramhorst i sar., 2012; Tirado-Gonzalez i sar., 2013]. Pored toga, u cirkulaciji žena sa višestrukim pobačajima povećano je prisustvo anti-galektin-1 antitela [Ramhorst i sar., 2012]. Spontani prekid trudnoće praćen je i smanjenom ekspresijom galektina-1 u tkivu placente [Liu i sar., 2006; Tirado-Gonzalez i sar., 2013]. Preeklampsija, specifična patologija u trudnoći, klinički se odlikuje hipertenzijom, proteinurijom i edemima. Pretpostavlja se da je neadekvatna invazija trofoblasta jedan od uzroka preeklampsije. Dok je ekspresija

galektina-1 povećana u placenti i decidui, kod pacijentkinja sa preeklampsijom smanjena je ekspresija galektina-1 u T ćelijama periferne cirkulacije [Molvarec i sar., 2011; Than i sar., 2008a]. Pored toga, u premalignim i malignim stanjima vezanim za trofoblast, koji se karakterišu povećanom invazijom trofoblasta, pokazana je povećana ekspresija galektina-1 i -3 [Božić i sar., 2004]. Horioamnionitis, kao jedan od uzročnika prevremenog porođaja i komplikacija trudnoće, između ostalog, odlikuje se i povećanom ekspresijom galektina-1 u fetalnim membranama [Than i sar., 2008b].

Povećana ekspresija galektina-1 u endometriјumu tokom luteinske faze menstrualnog ciklusa mogla bi uticati na decidualizaciju [Barrientos i sar., 2014]. Galektin-1, prisutan u značajnoj meri tokom cele trudnoće, u decidui se prevashodno nalazi u stromi [Vićovac i sar., 1998; von Wolff i sar., 2005]. Kako i decidualne i ćelije EVT sekretuju brojne ligande galektina-1 pretpostavljeno je da interakcijom sa FN i LN učestvuje u reorganizaciji ECM [Ozeki i sar., 1995; Zhou i Cummings, 1990].



Slika 9. Pretpostavljene uloge galektina-1 tokom trudnoće.

Osim što bi mogao da utiče na integritet decidualnog matriksa, galektin-1 decidualnog porekla bi mogao da deluje i na sam trofoblast (Slika 9). Tako je pokazano da egzogeno dodati galektin-1 stimuliše invaziju trofoblasta *in vitro* [Kolundžić i sar., 2011a].

Pokazano je da galektin-1 ispoljava antiinflamatorno dejstvo i da učestvuje u promovisanju tolerogenosti imunskog sistema, a njegovo imunomodulatorno delovanje je od značaja i u placenti [Than i sar., 2009; Than i sar., 2012]. Imunomodulatorna uloga galektina-1 tokom trudnoće ostvaruje se različitim mehanizmima [Blois i sar.,

2007; Than i sar., 2012]. Funkcionalna interakcija između endokrinog i imunskog sistema ostvaruje se preko galektina-1 i P₄ [Blois i sar., 2007]. Njihov sinergistički efekat omogućava sticanje imunološke tolerancije prema fetusu i doprinosi povećanju uspešnosti trudnoće, dok smanjenje bilo P₄ ili galektina-1 vodi ka povećanom riziku za pobačaj [Blois i sar., 2007].

Za razliku od galektina-1, galektin-3 ispoljava proinflamatorno dejstvo. Ovakvo delovanje galektina-3 može biti od značaja tokom implantacije, koja predstavlja inflamatorni proces. Pokazano je da galektin-3 može dvojako uticati na preživljavanje ćelija endometrijuma: endogeni galektin-3 potreban je za očuvanje integriteta epitela endometrijuma i kao zaštita reproduktivnog trakta od infekcije, dok s druge strane, egzogeni galektin-3, trofoblastnog porekla lokalno dovodi do narušavanja integriteta epitela, olakšavajući implantaciju embriona. Pokazano je da se efekat galektina-3 na vijabilnost ćelija ostvaruje posredstvom interakcije sa integrinima β1, odnosno β3 [Lei i sar., 2009; Yang i sar., 2012]. Tokom receptivne faze, galektin-3 je koeksprimiran sa β3 integrinom, pa je pretpostavljeno da bi interakcija ova dva molekula mogla biti od značaja tokom implantacije [Nikzad i sar., 2010].

Prisustvo galektina-3 je u negativnoj korelaciji sa invazivnim potencijalom trofoblasta [van den Brule i sar., 1994]. Galektin-3 je takođe povećan u preeklampsiji i HELLP (*Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low platelet count*) sindromu, patološkom stanju vezanom za trudnoću koje se, između ostalog karakteriše smanjenom invazivnošću trofoblasta [Jeschke i sar., 2007].

Galektin-8 je nedavno detektovan u trofoblastu, ali o njegovoj ulozi se skoro ništa ne zna [Kolundzic i sar., 2011b]. Kod različitih ćelija pokazano je da galektin-8 učestvuje u ćelijskoj adheziji *in vitro*, zahvaljujući svojim lektinskim svojstvima i interakcijom sa integrinima [Levy i sar., 2001]. Galektin-8 u trofoblastu je lokalizovan u ćelijskim stubovima EVT, pa je pretpostavljeno da bi mogao da utiče na adhezivna i migratorna svojstva trofoblasta, kao i u organizaciji ECM [Kolundzic i sar., 2011b].

1.3. Regulacija ekspresije galektina

Dok su neki galektini zastupljeni u skoro svim tkivima, drugi pokazuju tkivno-specifičnu lokalizaciju ili su eksprimirani samo u određenoj fazi razvića. Uz to, svaki od njih ispoljava specifične biološke uloge. Sve ovo ukazuje na neophodnu preciznu

regulaciju ekspresije galektina, kako bi ispoljili svoje delovanje u odgovarajućem tkivu u pravo vreme [Chiariotti i sar., 1999; Chiariotti i sar., 2004].

1.3.1. Steroid-regulatorne sekvence u promotorima gena za galektine-1, -3 i -8

Galektin-1 kodira gen *LGALS1*, koji je kod čoveka lociran na hromozomu 22 (22q13) i sastoji se od 4 egzona [Gitt i Barondes, 1991]. Obradom primarnog transkripta nastaje informaciona ribonukleinska kiselina (iRNK) dužine 0,6 kb, koja kodira protein od 135 AK [Chiariotti i sar., 2004]. U promotorskom regionu *LGALS1* gena postoje *glucocorticoid response element* (GRE) i *estrogen response element* (ERE) [Bourdeau i sar., 2004; Gitt i Barondes, 1991; Than i sar., 2008c]. Palindromska konsenzus ERE sekvenca u celosti je prisutna samo kod malog broja gena [Bourdeau i sar., 2004; Klein-Hitpass i sar., 1986]. Većina estrogen-zavisnih gena, među kojima je i gen za galektin-1, poseduje polu-ERE sekvencu, koja je takođe dovoljna za transkripcionu aktivnost [Welboren i sar., 2007]. U okviru promotorskog regiona *LGALS1* gena postoji još nekoliko, evolutivno očuvanih sekvenci uključenih u steroid-zavisnu transkripcionu regulaciju: AP-2, Sp1 i NF-Y vezujući motivi [Gitt i Barondes, 1991; Salvatore i sar., 1995; Than i sar., 2008c]. Uticaj steroida na regulaciju galektina-1 pokazan je i eksperimentalno. Najpre je demonstriran uticaj sintetskih glukokortikoida na galektin-1 u plućima pacova – uključujući transkripcionu i translacionu regulaciju, ali i stabilnost samog proteina [Clerch i sar., 1987; Sanford i sar., 1993]. Slično, galektin-1 prisutan u trofoblastnim ćelijskim linijama čoveka takođe pokazuje zavisnost od glukokortikoida i P₄ [Bojić-Trbojević i sar., 2008].

Gen za galektin-3, *LGALS3*, lociran je na hromozomu 14 (14q22.3) i kodira protein od 250 AK. U promotoru *LGALS3* prisutna je GRE sekvenca [http://www.sabiosciences.com/chipqpcrsearch.php?gene=LGALS3&factor=Over+200+TF&species_id=0&ninfo=n&ngene=n&nfactor=y]. Steroidni imunomodulatori mogu uticati na ekspresiju *LGALS3* gena posredstvom drugih transkripcionih faktora, čija vezujuća mesta takođe postoje u promotoru gena za galektin-3: nekoliko Sp1 vezujućih mesta, kao i vezujuća mesta za transkripcione faktore AP-1, AP4, NF-κB i CREB [Kadrofske i sar., 1998]. *In vitro* je pokazano da ekspresija *LGALS3* gena u makrofagama podleže uticaju kortizola i sintetskih glukokortikoida, ali i da efekti u velikoj meri zavise od vrsta ćelija, što se pripisuje ukrštanju sa drugim signalnim

putevima i regulaciji ekspresije glukokortikoidnog receptora [Dabelic i sar., 2006]. Druga grupa autora je pokazala da je regulacija galektina-3 u plućima takođe podložna uticaju DEX, ali da je efekat zavistan od tipa ćelija [Maldonado i sar., 2011].

U humanom genomu gen za galektin-8 (*LGALS8*) se nalazi na hromozomu 1 (1q43) [Bidon-Wagner i Le Pennec, 2004]. Alternativnom obradom primarnog transkripta nastaje nekoliko iRNK, od kojih su tri prototip galektini, a tri tandemski galektini. Svi transkripti koji kodiraju tandemski tip galektina-8 daju funkcionalne proteine. Transkripti koji u svojoj sekvenci sadrže stop kodon, kodiraju izoforme galektina-8 sa jednim CRD koje bi odgovarale prototip galektinu-8, ali za sada, odgovarajuće proteinske izoforme galektina-8 sa jednim CRD nisu izolovane. Pored toga, pokazano je da i u promotoru gena za galektin-8 postoji ERE [http://www.sabiosciences.com/chipqpcrsearch.php?gene=LGALS8&species_id=0&factor=Over+200+TF&ninfo=n&ngene=n&nfactor=n].

Kako je sinteza steroidnih hormona za vreme trudnoće izrazita, postoji mogućnost da ovi hormoni neke od svojih efekata ispoljavaju posredstvom modulacije ekspresije gena za galektine u placenti.

1.3.2. Steroidni hormoni i trudnoća

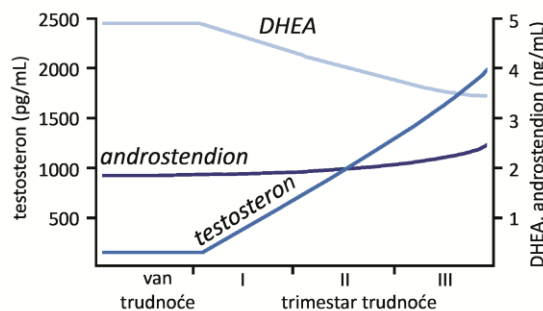
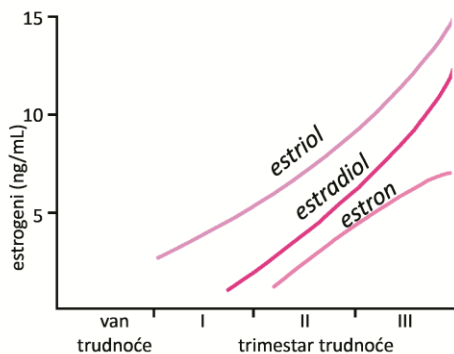
Progesteron i estradiol (E_2) regulišu funkcionisanje ženskog reproduktivnog trakta. Ovi steroidi omogućavaju uspostavljanje trudnoće i njeno održavanje do porođaja. Njihov uticaj se ispoljava i na majku i na embrion/fetus. Između ostalog, steroidni hormoni pripremaju endometrijum za implantaciju, posreduju u inicijalnoj interakciji između blastociste i uterusa, regulišu proces implantacije i formiranje placente, utiču na proliferaciju, diferencijaciju i invaziju trofoblasta.

1.3.2.1. Sinteza steroidnih hormona tokom trudnoće

Placenta je važan endokrini organ koji sintetisuje proteinske, peptidne i steroidne hormone. Koncentracija steroidnih hormona tokom trudnoće raste u krvotoku majke, ali i fetusa (Slika 10) [Gardner i Shoback, 2007]. Pored sinteze, placenta i metaboliše steroidne hormone, regulišući dostupnost hormona iz krvi majke do fetusa. Receptori za steroidne hormone prisutni su u placenti, tako da steroidi sintetisani u placenti mogu ispoljavati i autokrino i parakrino dejstvo.

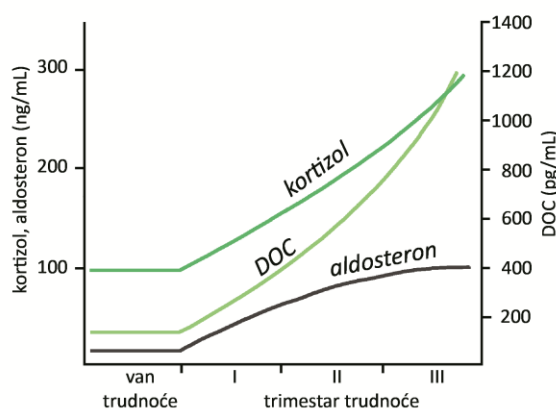
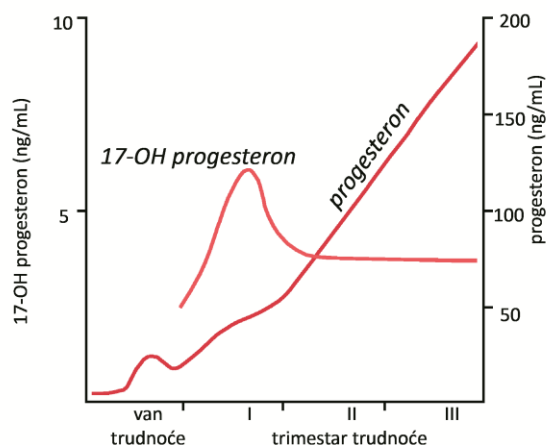
Fetoplacentni estrogeni		
estradiol	raste tokom trudnoće	42-52 nmol/L (termin)
estriol	raste tokom trudnoće	55-62 nmol/L (termin)
estron	raste tokom trudnoće	18,5-26 nmol/L (termin)

Fetoplacentni androgeni		
DHEA	opada tokom trudnoće	17,3 nmol/L (pre trudnoće)
testosteron	raste tokom trudnoće	6,9 nmol/L (termin)
androstendion	blagi rast tokom trudnoće	9 nmol/L (termin)



Gestageni placente i žutog tela		
progesteron	raste tokom trudnoće	550 nmol/L (termin)
17-OH progesteron	maksimum u 5. nedelji, zatim opada	19 nmol/L (5. nedelja)

Hormoni kore nadbubrežne žlezde		
kortizol	raste tokom trudnoće	0,83 μmol/L (termin)
aldosteron	plato oko 34. nedelje, spori rast do porođaja	277 nmol/L (termin)
DOC	raste tokom trudnoće	3,48 nmol/L (termin)



Slika 10. Profil steroidnih hormona u krvi majke tokom trudnoće (modifikovano prema Gardner i Schoback, 2007).

Prvi biohemijski pokazatelj trudnoće, humani horionski gonadotropin (hCG) može se detektovati u cirkulaciji majke tri dana nakon implantacije [Cole, 2009]. U prvih šest nedelja hCG je neophodan za održavanje trudnoće zahvaljujući svom luteotropnom delovanju: pod uticajem hCG žuto telo jajnika sintetiše P₄ i E₂ [Hanson i sar., 1971; Malassine i Cronier, 2002]. Sintaza P₄ i E₂ u placenti započinje oko šeste nedelje trudnoće, da bi nakon 10. nedelje placenta postala glavni izvor steroidnih hormona [Aspillaga i sar., 1983; Csapo i sar., 1972; Scott i sar., 1991]. Placenta

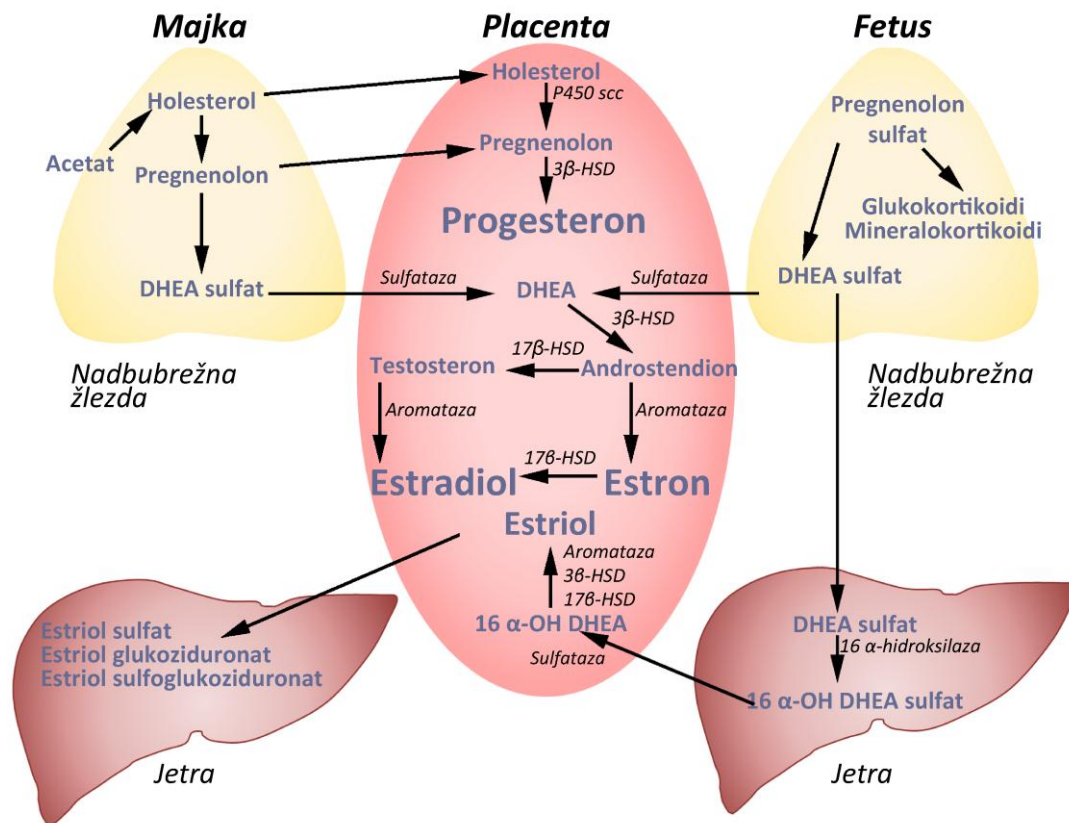
preuzima od žutog tela (tzv. luteoplacentni pomak) glavnu ulogu u steroidogenezi približno istovremeno kada započinje invazija spiralnih arterija, odnosno sa prelaskom iz hipoksičnog u normoksično stanje [Jauniaux i sar., 2000]. Pretpostavlja se da bi priliv kiseonika, koji je neophodan za oksidaciju holesterola, mogao biti jedan od faktora koji indukuje sintezu P_4 u placenti [Schneider, 2000; Tuckey, 2005]. Funkcionalna sposobnost placente da u potpunosti preuzme sintezu P_4 i E_2 je vrlo bitna za održavanje trudnoće – nagli pad nivoa P_4 i estrogena u krvi majke oko 8. nedelje trudnoće povezan je sa spontanim pobačajima [Aspillaga i sar., 1983].

Složene interakcije između majke i fetusa omogućavaju steroidogenezu tokom trudnoće. Placenta, kora nadbubrežnih žlezda fetusa, odnosno majke čine posebnu endokrinu celinu – fetoplacentnu jedinicu (Slika 11) [Diczfalusy, 1964; Kronenberg i Williams, 2008]. Sinteza steroidnih hormona u placenti odvija se iz prekursora koji potiču iz majke i iz ploda: P_4 se sintetiše *de novo* iz holesterola, dok je sinteza estrogena zavisna od androgenih prekursora poreklom iz fetusa i majke [Ryan, 1959]. Dve grupe enzima uključene su u sintezu steroida: monooksigenaze iz familije citohrom P450 proteina (CYP) i hidroksteroid dehidrogenaze (HSD). U odnosu na steroidogenezu u kori nadbubrežne žlezde odraslih i u gonadama, u placenti postoje neke specifičnosti vezane za transportne, enzimске i regulatorne mehanizme.

Endokrinu funkciju placente vrši STB. Čelije STB su u direktnom kontaktu sa krvlju majke: iz krvotoka majke ćelije STB mogu preuzimati potrebne prekursore za sintezu hormona, odnosno sekretovati sintetisane hormone u cirkulaciju majke.

Značajnu ulogu u steroidogenezi tokom trudnoće imaju i fetalne nadbubrežne žlezde. Pred porođaj, masa kore nadbubrežnih žlezda fetusa je kao kod odraslih, dok je sinteza steroidnih hormona čak i intenzivnija nego kod odraslih [Rainey i sar., 2004]. U nadbubrežnoj žlezdi fetusa razlikuju se tri morfološke i funkcionalne zone:

- fetalna zona (kod odraslih *zona reticularis*) – primarno mesto steroidogeneze kod fetusa, gde delovanjem enzima 17 α -hidroksilaza/17,20 liaza (CYP17A1) nastaje dehidroepiandrosteron (DHEA),
- fetalni neokorteks (kod odraslih *zona glomerulosa*) - mesto sinteze aldosterona delovanjem enzima 3 β -HSD,
- prelazna zona (kod odraslih *zona fascicularis*) u kojoj se aktivnošću CYP17A1 i 3 β -HSD sintetiše kortizol [Mesiano i Jaffe, 1997].



Slika 11. Putevi sinteze progesterona i estrogena u placenti tokom trudnoće
(modifikovano prema Kronenberg i Williams, 2008).

Steroidne hormone mogu sintetisati i neke trofoblastne ćelijske linije: JEG-3, JAR i BeWo [Bahn i sar., 1981]. Ipak, u *in vitro* uslovima, sinteza P₄ može biti znatno ograničena, jer uobičajeni sastav medijuma u kojima se ćelije održavaju ne obezbeđuje potrebne količine holesterola [Tuckey, 2005]. S druge strane, pokazano je da horiokarcinomske JAR ćelije sintetišu E₂, ukoliko se gaje u medijumu u koji je dodat androstendion [Barbieri i sar., 1986]

1.3.2.1.1. Sinteza progesterona

Osnovni prekursor za sintezu P₄ u placenti je holesterol iz cirkulacije majke, koga ćelije STB preuzimaju iz lipoproteinskih čestica receptor-zavisnom endocitozom [Gwynne i Strauss, 1982; Strauss i sar., 1996]. Kako visoke koncentracije holesterola blokiraju aktivnost 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA reduktaze (HMGC_oA reduktaze), ključnog enzima u sintezi holesterola, u ćelijama trofoblasta *de novo* sinteza holesterola iz acetata je zanemarljiva [van Leusden i Vilee, 1965].

Sinteza P_4 iz holesterola odvija se u dva koraka. Najpre se, oksidacijom bočnog lanca, holesterol konvertuje u pregnenolon. Drugi korak u sintezi P_4 , prevođenje pregnenolona u P_4 , katalizuje 3β -HSD tip I, koji se razlikuje se od izoenzima u gonadama i kori nadbubrežne žlezde [Beaudoin i sar., 1997b; Strauss i sar., 1996]. Aktivnost 3β -HSD u nadbubrežnoj žlezdi fetusa je niska tako da je fetalni udeo u sintezi P_4 gotovo beznačajan [Csapo i sar., 1973]. Količina sintetisanog P_4 progresivno raste tokom trudnoće. Pred porođaj placenta dnevno sintetiše 250-300 mg P_4 , što je oko 10 puta više nego tokom luteinske faze menstrualnog ciklusa [Lin i sar., 1972; Strauss i sar., 1996]. Sinteza P_4 u placenti je esencijalna za održavanje trudnoće. Tako, mutacije enzima CYP450_{sc} ili 3β -HSD tip I, koje bi dovele do prekida sinteze P_4 u placenti, nisu ni zabeležene [Rheaume i sar., 1992; Strauss i sar., 1996].

1.3.2.1.2. Sinteza estrogena

Placenta sintetiše tri estrogena: E_2 , estron i estriol. Estrogeni hormoni prisutni su u krvotoku majke, fetusa i pupčanika, dok se njihovi metaboliti ekskretuju urinom majke. Sinteza estrogena raste tokom trudnoće, tako da je pred porođaj koncentracija E_2 oko 100, a estriola oko 1000 puta veća nego kod žena van trudnoće.

Za razliku od jajnika i žutog tela, placenta nema enzim CYP17A1, te u placenti nije moguća sinteza estrogena *de novo* iz acetata ili iz P_4 kao prekursora [Albrecht i Pepe, 1990; Kuss, 1994]. Odsustvo CYP17A1 u placenti je adaptivni mehanizam koji omogućava istovremenu sintezu P_4 i estrogena, ali ne i prekomernu konverziju P_4 u estrogene, niti izlaganje majke i fetusa dejstvu androgena [Sanderson, 2009]. Androgeni prekursori placentnih estrogena, DHEA i njegov sulfat DHEAS sintetišu se u nadbubrežim žlezdama majke i fetusa [Jackson i Albrecht, 1985]. Oko 50-60% DHEA poreklom je iz fetusa, a ostatak od majke [Albrecht i Pepe, 1990]. Enzim 3β -HSD prevodi DHEA u androstendion, koji se zatim prevodi u estrogene delovanjem aromataze [Miller, 1998]. Unutar STB, enzimi uključeni u sintezu estrogena, aromataza (CYP19) i sulfataza locirani su na apikalnoj strani, pa je sekrecija estrogena usmerena ka krvotoku majke [Strauss i sar., 1996]. U sintezi placentnih estrogena učestvuje i enzim 16α -hidroksilaza, eksprimiran samo u fetalnoj jetri. Hidroksilacijom DHEA i DHEAS nastaju $16OH$ -derivati, prekursori estriola. Estrogena aktivnost estriola je zanemarljiva. Međutim, kako $16OH$ -DHEAS nastaje samo u fetusu, klinički značaj

određivanja estriola ogleđa se u praćenju vitalnosti fetusa. Tako su, na primer, Daunov (trizomija 21) i Edvardsov (trizomija 18) sindrom praćeni niskim vrednostima estriola u krvi majke [Graves i sar., 2002; Phillips i sar., 1992].

Sinteza i metabolizam drugih steroidnih hormona u placenti delimično su regulisani E_2 [Cronier i sar., 1999]. Estradiol pospešuje sintezu P_4 u placenti tako što: 1) stimuliše ekspresiju LDL-receptora i preuzimanje holesterola i 2) indukuje aktivnost $P450_{sc}$ i 11β -HSD [Babischkin i sar., 1996; Babischkin i sar., 1997; Beaudoin i sar., 1997a; Grimes i sar., 1996; Henson i sar., 1988]. Regulatorna sprega između nadbubrežnih žlezda fetusa i placente određuje dinamiku steroidogeneze u placenti: placentni estrogeni negativnom povratnom spregom utiču na sintezu androgena u nadbubrežnim žlezdama [Pepe i Albrecht, 1990]. Regulacijom ekspresije enzima 11β -HSD, E_2 moduliše transport i metabolizam kortizola u placenti, a samim tim utiče i na funkcionalno sazrevanje nadbubrežne žlezde fetusa [Albrecht i Pepe, 1999; Baggia i sar., 1990].

Jedno novije istraživanje pokazalo je prisustvo enzima CYP17 u izolovanim ćelijama CTB u kulturi, kao i u horiokarcinomskoj ćelijskoj liniji JEG-3 [Escobar i sar., 2011]. Ostaje da se utvrdi koliki je značaj endogene sinteze estrogena unutar placente.

1.3.2.2. Distribucija receptora za steroidne hormone u placenti

Steroidni hormoni, estrogeni, progestini, androgeni, glukokortikoidi i mineralokortikoidi, odgovorni su za transkripcionu kontrolu i regulaciju genske ekspresije [Clever i Karlson, 1960]. Svoje genomske delovanje ostvaruju posredstvom receptora koji su po svojoj funkciji transkripcioni faktori, i putem njih steroidni hormoni modulišu ekspresiju ciljnih gena [Jensen i sar., 1968]. Receptori za steroidne hormone pripadaju superfamiliji nuklearnih receptora: progesteronski, androgeni, glukokortikoidni i mineralokortikoidni receptori pripadaju subfamiliji 3C, dok receptori za estrogene čini zasebnu grupu, 3A [Dahlman-Wright i sar., 2006; Lu i sar., 2006]. Ovi receptori se sastoje iz nekoliko funkcionalnih domena: ligand-vezujućeg domena, zglobnog regiona, domena koji vezuje dezoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) i domena koji aktivira transkripciju [Beato, 1989].

Vezivanje hormona za receptor indukuje njegovu dimerizaciju i translokaciju kompleksa hormon-receptor iz citoplazme u jedro. U jedru, kompleks se vezuje za

odgovarajuću sekvencu HRE (*hormone response element*) u promotoru ciljnog gena. Po strukturi, HRE predstavljaju palindromske sekvence, sastavljene iz dva invertovana niza nukleotida, razdvojena segmentom od tri nukleotida. Dve heksamerne sekvence čine GRE, dok se ERE sastoji iz dve pentamerne (polu-HRE) sekvence (Tabela II). Interakcijom sa koaktivatorima ili korepresorima, kompleks hormon-receptor indukuje ili suprimira ekspresiju ciljnog gena. Pored HRE, steroidni receptori mogu da interaguju i sa *cis*-regulatornim elementima za druge transkripcione faktore.

Tabela II Konzensus HRE (*hormone response elements*) sekvence (modifikovano prema Dahlman-Wright i sar., 2006; Lu i sar., 2006).

HRE	Sekvenca
GRE	5' – GGTACAnnnTGTTCT – 3'
ERE	3' – GGTCAnnnTGACC – 3'

A – adenin, G – guanin, T – timin, C – citozin, n – bilo koji nukleotid

Postoji više formi i varijanti receptora za steroidne hormone. Estrogenske receptore (ER) ER α i ER β kodiraju dva različita gena [Dahlman-Wright i sar., 2006]. Dva osnovna tipa progesteronskih receptora (PR), PRA i PRB, kodirani su od strane istog gena, u okviru koga se nalaze dva transkripciona starta [Kastner i sar., 1990; Misao i sar., 1998]. Prisustvo PR demonstrirano je u placenti tokom celog gestacijskog perioda [Rossmann i sar., 1997].

Iako je neosporno da je placenta estrogen-zavisno tkivo, prisustvo ER u placenti je do skora bilo diskutabilno [Bukovsky i sar., 2003a]. U *in vitro* uslovima, pokazano je da STB eksprimira ER [Billiar i sar., 1997]. Estrogenski receptor je takođe nađen u placenti babuna, neprimatske vrste majmuna, koja je predložena kao pogodan eksperimentalni model za proučavanje endokrinoloških aspekata trudnoće [Pepe i Albrecht, 1998]. Tek detaljnom analizom tkiva, primenom imunohistohemije, Western blota i PCR analize, pokazano je da humana placenta trećeg trimestra eksprimira ER α i ER β [Bukovsky i sar., 2003b; Bukovsky i sar., 2003a]. Posebno je interesantno, da je distribucija ER α i ER β različita i da prati diferencijaciju trofoblata. ER α je karakterističan za vilusni trofoblast, ali se gubi tokom sincicijalizacije, iako E₂ stimuliše formiranje sincicijuma [Bukovsky i sar., 2003a]. Činjenica da izolovane CTB ćelije u kulturi ipak ispoljavaju ER α , za razliku od CTB *in vivo*, sugeriše da je ekspresija ovog

receptora suprimirana *in vivo* [Bukovsky i sar., 2003a]. Prisustvo ER β pokazano je i u STB i u EVT [Bukovsky i sar., 2003b]. Pored toga, nedavno je pokazano prisustvo ER β i u ćelijskoj kulturi EVT [Cervellati i sar., 2013].

Najzastupljeniji steroidni receptor u humanoj placenti prvog trimestra je glukokortikoidni receptor (GR), koji je lokalizovan u CTB i ćelijama vilusne strome [Chan i sar., 2003]. U humanoj placenti trećeg trimestra GR je umereno eksprimiran u CTB i slabo u STB, a može biti prisutan u inaktivnoj, nefosforilisanjoj i aktivnoj, fosfoformi [Lee i sar., 2005]. Pored toga, u humanoj placenti trećeg trimestra pokazano je prisustvo i nekoliko različitih molekulskih formi GR [Saif i sar., 2014].

Efekat steroidnih hormona i njihovih analoga ne ostvaruje se uvek na nivou transkripcione regulacije [Yoon i sar., 1998]. Tokom decidualizacije, P₄ i E₂ menjaju nivoe mnogih proteina čiji geni u svojim regulatornim sekvencama nemaju steroidvezujuće elemente. U ovom slučaju efekat steroidnih hormona ostvaruje se indirektno, posredstvom nishodnih, steroid-zavisnih efektor, među kojima su brojni peptidni hormoni, citokini i faktori.

1.3.2.3. Uloga progesterona i estrogena u decidualizaciji, implantaciji i placentaciji

Uterus je steroid-zavisni organ, u kome su eksprimirana oba tipa PR (PRA i PRB), kao i oba tipa ER (ER α i ER β). Ciklične promene E₂ i P₄ tokom mesečnog ciklusa utiču na morfološka i funkcionalna svojstva endometrijuma. Pod uticajem E₂, tokom folikularne faze, epitelne ćelije endometrijuma proliferišu i diferenciraju se, a P₄ tokom druge polovine menstrualnog ciklusa indukuje proliferaciju i diferencijaciju epitelnih i žlezdanih ćelija endometrijuma, stimulišući njihovu sekretornu aktivnost [de Ziegler i sar., 1998]. Dok P₄ ispoljava utero-relaksantno dejstvo, E₂ povećava kontraktilnost uterusa, što može imati negativan uticaj na implantaciju [de Ziegler i sar., 1998].

Decidualizacija, proces remodelovanja uterusa, omogućava stvaranje adekvatne sredine za eventualnu implantaciju [Carson i sar., 2000; Gellersen i sar., 2007]. Kod žena, decidualizacija, započinje sredinom luteinske faze menstrualnog ciklusa, dakle prethodi eventualnoj oplodnji jajne ćelije [de Ziegler i sar., 1998]. Reorganizovanjem ECM endometrijuma tokom decidualizacije, formira se sredina koja ima za cilj da reguliše invaziju ćelija trofoblasta i onemogući njegovo preterano prodiranje u

unutrašnjost uterusa. Decidualni matriks predstavlja fizičku prepreku koja usporava napredovanje trofoblasta, ali i ćelije decidualne strome sintetišu brojne regulatore invazije trofoblasta.

Inicijalni kontakt između trofoblasta i luminalnog epitela endometrijuma predstavlja biološki paradoks – interakciju dve apikalne epitelne membrane, koji je omogućen fenotipskom reorganizacijom spoljašnje površine trofektoderma i epitela uterusa [Carson i sar., 2000; Denker, 1993]. Regulacijom ekspresije adhezivnih molekula, integrina, glikoproteina i lektina prisutnih na obe površine, P₄ i E₂ učestvuju u sinhronizaciji uterusa i embriona pri implantaciji [Bowen i Hunt, 2000; Denker, 1993].

Kod čoveka je pokazano da je nivo E₂ kritičan za implantaciju. Tokom asistirane reprodukcije, hiperstimulacija jajnika često dovodi do povećane koncentracije E₂, što se negativno odražava na implantaciju. U ovakvim slučajevima visok nivo E₂ 1) remeti pravovremeni porast nivoa P₄, pa receptivnost endometrijuma prethodi razvoju implantaciono kompetentne blastociste ili 2) povećava kontraktilnost endometrijuma [de Ziegler i sar., 1998; Fatemi i Popovic-Todorovic, 2013].

Mucin 1 (MUC1), glikoprotein značajan za implantaciju, eksprimiran je i u endometrijumu, ali i na spoljašnjoj strani trofektoderma [Meseguer i sar., 2001]. Van receptivne faze, luminalna površina endometrijuma je pokrivena gustim slojem MUC1, čija antiadhezivna svojstva onemogućavaju pristup embriona endometrijumu [Aplin i sar., 2001; Meseguer i sar., 1998]. Pokazano je da je uticaj steroidnih hormona na ekspresiju MUC1 *species*-specifičan – tokom receptivne faze ekspresija MUC1 je smanjena kod miša, dok je kod čoveka ekspresija MUC1 najizraženija u receptivnoj fazi [Brayman i sar., 2006; Hey i sar., 1994; Meseguer i sar., 2001; Surveyor i sar., 1995]. Pretpostavka je da je različit efekat P₄ na ekspresiju MUC1 u endometrijumu miša i čoveka posledica delovanja P₄ preko različitih tipova receptora [Brayman i sar., 2006]. Dok je kod žena ekspresija MUC1 u endometrijumu tokom receptivne faze stimulisana P₄, blastocista, sa druge strane, parakrinom regulacijom dovodi do smanjenja ekspresije MUC1 na malom delu površine endometrijuma, predodređenom za implantaciju [Meseguer i sar., 2001].

Slično kao i MUC1, ekspresija integrina u endometrijumu prati promene u nivou P₄ i E₂, ukazujući na njihovu steroid-zavisnu regulaciju [Bowen i sar., 1996; Lessey i

sar., 1996]. Integrini eksprimirani tokom receptivne faze na epitelu endometrijuma, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha v\beta 1$ i $\alpha v\beta 3$ mogli bi biti uključeni u inicijalnim fazama implantacije [Aplin i sar., 1996; Bowen i Hunt, 2000]. Prisustvo $\alpha v\beta 3$ i $\alpha v\beta 5$ integrina pokazano je i na površini preimplantacionog embriona čoveka [Campbell i sar., 1995].

Tokom trudnoće ćelije trofoblasta su izložene visokim koncentracijama P_4 i E_2 [Tulchinsky i sar., 1972]. Estradiol je odgovoran za morfološku i funkcionalnu diferencijaciju trofoblasta, pre svega vilusnog CTB [Cronier i sar., 1999; Pepe i Albrecht, 1999]. Pod uticajem E_2 stimulirana je ekspresija koneksina 43, formiranje međućelijskih veza i sincicijuma [Bukovsky i sar., 2003a; Cronier i sar., 1999].

Osim vezivanja za nuklearne receptore i regulacije genske ekspresije, steroidni hormoni mogu delovati i posredstvom membranskih receptora, preko kojih ostvaruju brze, negenomske efekte. Negenomska aktivnost E_2 , posredovana membranskim receptorom, pokazana je u trofoblastu *in vitro* [Gambino i sar., 2010]. Međutim, još uvek nije u potpunosti ispitan značaj membranskog signalnog puta E_2 u trofoblastu.

1.3.2.4. Značaj glukokortikoida u placenti

Tokom trudnoće koncentracija kortizola progresivno raste u krvi majke odnosno fetusa [Dorr i sar., 1989; Gardner i Shoback, 2007]. Iako placenta ne učestvuje u sintezi kortizola, ima važnu ulogu u njegovom metabolizmu, čineći barijeru između majke i fetusa [Benediktsson i sar., 1997]. Metabolizam kortizola i njegov protok kroz placentu regulisani su izoenzimima 11β -HSD tip 1 i tip 2. Izoenzim 11β -HSD tip 1, karakterističan za organizam majke, katalizuje reakciju ka kortizolu, dok je prevođenje kortizola u kortizon delovanjem 11β -HSD tip 2 favorizovano u placenti tokom najvećeg dela gestacije [Michael i Papageorghiou, 2008]. Fiziološki značaj inaktivacije kortizola je sprečavanje stalne stimulacije aldosteronskog receptora kortizolom, odnosno zaštita fetusa i placente od prekomernog uticaja ovog kortikosteroida iz cirkulacije majke [Benediktsson i sar., 1997; Krozowski i sar., 1995]. Krajem trudnoće, umesto 11β -HSD tip 2, u placenti preovladava prisustvo 11β -HSD tipa 1. Smatra se da tada porast kortizola antagonizuje efekat P_4 , što bi moglo biti značajno za iniciranje porođaja [Murphy i Clifton, 2003]. Pored regulacije E_2 , aktivnost enzima 11β -HSD podleže i autoregulaciji od strane glukokortikoida [van Beek i sar., 2004]. Za razliku od kortizola, sintetski glukokortikoidi, kao što su deksametazon (DEX), triamcinolon i betametazon

uglavnom nisu supstrati za 11β -HSD, pa se mogu naći u tkivu placente [Murphy i sar., 2007]. Sintetski glukokortikoidi su potentniji u odnosu na fiziološki glukokortikoid kortizol, dok je njihovo mineralokortikoidno dejstvo znatno manje izraženo (Tabela III) [Varagić i Milošević, 2002].

Tabela III Usporedne karakteristike prirodnih i sintetskih kortikosteroida (modifikovano prema Varagić i Milošević, 2002).

Glukokortikoid	Glukokortikoidna aktivnost	Mineralokortikoidna aktivnost
Kortizol	1	1
Kortizon	0,8	0,8
Prednizon	3,5-5	0,8
Prednizolon	4	0,8
Metilprednizolon	5-7,5	0,5
Deksametazon	25-80	0
Betametazon	25-30	0
Triamcinolon	5	0
Aldosteron	0,3	200-1000

Primena glukokortikoida tokom prvog trimestra trudnoće, uglavnom je indikovana oboljenjima majke, kao što su astma ili alergije [Lunghi i sar., 2010]. U ovim slučajevima najčešće se primenjuju sintetski inhalacioni glukokortikoidi, male sistemske distribucije, ali ipak postoji mogućnost njihovog uticaja na placentu i fetus. Glukokortikoidi se znatno češće primenjuju u drugoj polovini trudnoće, pre svega kada postoji rizik od prevremenog porođaja. Sintetski glukokortikoidi ubrzavaju maturaciju organa fetusa i smanjuju rizik za pojavu neonatalnog respiratornog distres sindroma.

Na izolovanim CTB ćelijama humane placente, kako prvog, tako i trećeg trimestra, pokazano je da sintetski glukokortikoidi stimulišu sintezu hCG, što bi takođe moglo povoljno uticati bilo na implantaciju ili održavanje trudnoće [Guller i sar., 1994; Ringler i sar., 1989]. U ćelijama koje ne ekspimiraju GR nivo hCG se nije menjao, ukazujući da se stimulatorni efekat glukokortikoida na sekreciju hCG ostvaruje posredstvom GR [Mandl i sar., 2006]. Glukokortikoidi utiču i na sintezu E_2 , direktno

stimulišući aktivnost aromataze u STB [Wang i sar., 2012]. Pored toga, glukokortikoidi suprimiraju i ekspresiju komponenti ECM u kulturi trofoblastnih ćelija [Guller i sar., 1993a; Guller i sar., 1993b; Ryu i sar., 1999]. Inhibicija sinteze onkofetalnog fibronektina (onfFN) i laminina (LN) glukokortikoidima znatno je izraženija u CTB trećeg trimestra u odnosu na CTB prvog trimestra [Guller i sar., 1994]. Suprimirajući efekat je specifičan i selektivan – postiže se glukokortikoidima, ali ne i drugim steroidnim hormonima, i odražava se na sintezu proteina ECM, ali ne i ukupnih proteina [Guller i sar., 1993a; Guller i sar., 1994]. Pokazano je da DEX takođe inhibira sintezu integrina $\alpha 2$ i $\beta 1$ u citotrofoblastnim ćelijama u kulturi [Ryu i sar., 1999]. Različit efekat glukokortikoida tokom prvog i trećeg trimestra mogao bi imati funkcionalni značaj. Sinteza ECM i adhezija placente i uterusa favorizovani su u prvom trimestru, kada je koncentracija kortizola niska i njegov efekat skoro zanemarljiv. Krajem trudnoće, ravnoteža se pomera od kortizona ka kortizolu i dolazi do nishodne regulacije fibronektina, jednog od osnovnih adhezivnih molekula u placenti, što bi moglo da bude u vezi sa nastupajućim porođajem [Yoon i sar., 1998].

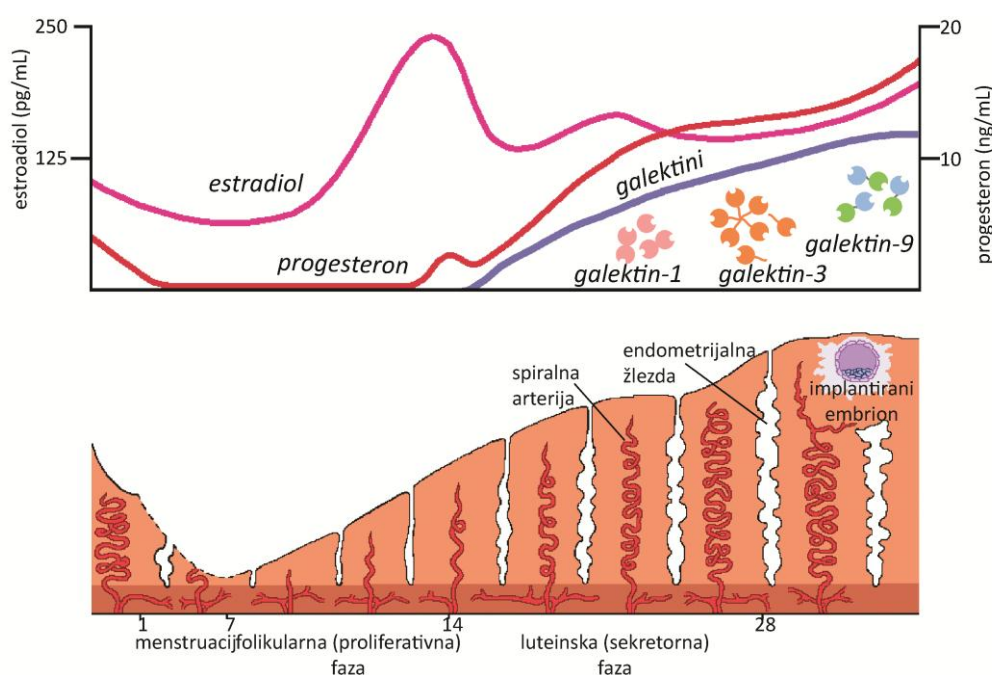
Glukokortikoidi mogu imati i stimulatorni efekat na diferencijaciju trofoblasta, što je pokazano u *in vitro* uslovima. Deksametazon indukuje fuziju ćelija i sintezu peptidnih hormona, usmeravajući diferencijaciju ka sincicijalnom fenotipu [Cronier i sar., 1998].

Iskustva iz reproduktivne medicine pokazala su da, u određenim slučajevima, imunosupresivno delovanje glukokortikoida može doprineti poboljšanju uspešnosti začeća [Boomsma i Macklon, 2008; Siristatidis i sar., 2013; Zhu i sar., 2013]. Delovanjem na intrauterino okruženje i promocijom imunološke tolerancije, glukokortikoidi u nekim slučajevima povećavaju šansu za uspešno začeće u postupcima vantelesne oplodnje (IVF) ili kod žena koje su imale višestruke pobačaje [Boomsma i sar., 2012; Quenby i sar., 2005]

1.3.3. Uticaj steroidnih hormona na galektine u trofoblastu i placenti

Ekspresija galektina je vremenski i prostorno precizno regulisana u reproduktivnom traktu žena (Slika 12) i eksperimentalnih životinja. Nivo galektina menja se tokom menstrualnog ciklusa u endometrijum, tokom implantacije i kasnije u decidui, prateći promene u nivoima P_4 i E_2 , pa je pretpostavljeno da je ekspresija galektina pod uticajem ovih hormona [Blois i Barrientos, 2014; Choe i sar., 1997; von

Wolff i sar., 2005]. Kod miša, E_2 i P_4 , posredstvom steroidnih receptora, indukuju ekspresiju galektina-1 u endometriju tokom receptivne faze, što bi moglo uticati na samu implantaciju [Choe i sar., 1997]. Prisustvo galektina-1 i -3 je naročito izraženo u decidualnim ćelijama strome, ali ne i u epitelu lumena i žlezdama miša [Phillips i sar., 1996]. Na mišjem modelu je takođe pokazano da P_4 direktno utiče na nivo galektina-1: odsustvo PR ili adaptornog proteina za PR, košaperona FKBP52, dovodi do smanjene sinteze galektina-1 [Hirota i sar., 2012]. Tako bi jedan od načina na koji P_4 ostvaruje svoju ulogu tokom trudnoće mogao biti i posredstvom regulacije ekspresije galektina-1 [Blois i sar., 2007].



Slika 12. Profil steroidnih hormona i galektina u endometriju tokom menstrualnog ciklusa (modifikovano prema Blois i Barrientos, 2014).

Pokazano je da steroidni hormoni u *in vitro* uslovima utiču i na ekspresiju galektina u ćelijama trofoblasta [Bojić-Trbojević i sar., 2008]. Međutim, i sam galektin-1 može regulisati sintezu P_4 *in vivo* i *in vitro*. Kod miša, tretman galektinom-1 je doveo do porasta koncentracije P_4 u serumu, dok je nasuprot tome, u BeWo horiokarcinomskim ćelijama galektin-1 suprimirao sintezu P_4 [Blois i sar., 2007; Jeschke i sar., 2004].

Ciljevi

Modulacija ekspresije galektina može se odraziti na promene u diferencijaciji/invaziji trofoblasta, procesima ključnim za formiranje placente i uspeh trudnoće. Iako je poznato da galektini mogu učestvovati u različitim reproduktivnim procesima, faktori koji utiču na njihovu ekspresiju u trofoblastu su nedovoljno ispitivani. Molekuli za koje postoji opravdana pretpostavka da bi mogli uticati na produkciju galektina-1, -3 i -8 prisutnih u ekstravilusnom trofoblastu su steroidni hormoni.

Zbog toga su u ovom radu postavljeni sledeći ciljevi:

- ispitivanje uticaja steroidnih hormona i antagonista steroidnih receptora na galektin-1, -3 i -8 na nivou transkripcije, translacije i sekrecije u EVT *in vitro*,
- ispitivanje uticaja steroidnih hormona na funkcionalna svojstva EVT testovima ćelijske vijabilnosti, migracije i invazije *in vitro*,
- izolovanje i karakterizacija galektina-1 iz humane placente trećeg trimestra,
- proizvodnja poliklonskih antitela prema galektinu-1 i njihova karakterizacija,
- razvoj ELISA testa za određivanje galektina-1 u biološkom materijalu.

Materijal i metode

3.1. Kultura ćelija

Ispitivanja u ovom radu obavljena su na ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo, dobijenoj ljubaznošću dr Čarlsa Grejema (dr Charles H. Graham, Queen's University Kingston, ON, Canada). HTR-8/SVneo ćelijska linija dobijena je transfekcijom ekstravilusnih ćelija humane placente prvog trimestra trudnoće SV40 T antigenom [Graham i sar., 1993]. Ova ćelijska linija je proliferativna i invazivna, sekretuje hCG i eksprimira markere invazivnih ekstravilusnih ćelija: citokeratin-7, citokeratin-18 i HLA-G [Ji i sar., 2013; King i sar., 2000]. Ćelije su adherentne i formiraju jednoćelijski sloj kada se gaje na plastičnoj ili staklenoj podlozi.

Osnovni medijum za održavanje HTR-8/SVneo ćelijske linije je *Roswell Park Memorial Institute* 1640 medijum (RPMI 1640, PAA Laboratories, Linz, Austria), sa ili bez indikatorske boje fenol crveno. Dodatkom fetalnog telećeg seruma (FCS, PAA Laboratories, Linz, Austria), koji je prethodno inaktivisan na 56 °C tokom 1 h, u količini od 5% (v/v) u finalnoj smeši i koktela antibiotika (penicilina G i streptomycin sulfata) i antimikotika (amfotericina B) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) u količini od 1% (v/v) u finalnoj smeši, pripremljen je kompletan medijum. HTR-8/SVneo ćelije gajene su u kompletnom medijumu, na plastičnoj podlozi (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), na 37 °C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂.

Ranije je pokazano da fenol crveno (koji se dodaje kao pH indikator u medijume za ćelijske kulture) ima slab estrogenski efekat [Berthois i sar., 1986]. Koncentracija fenol-crvenog prisutna u medijumima za ćelijske kulture odgovara koncentraciji E₂ od 0,45 nM [Bukovsky i sar., 2003a]. Pored toga, i FCS, čije prisustvo je neophodno za optimalni rast ćelija, sadrži određenu količinu steroidnih hormona. Stoga je, za potrebe ispitivanja uticaja steroidnih hormona i steroidnih antagonista korišćen RPMI 1640 medijum bez fenol crvenog, dok su iz FCS steroidni hormoni uklonjeni tretiranjem aktivnim ugljem (sFCS). Ovako modifikovan kompletni medijum označen je kao medijum za steroide.

3.1.1. Postupak uklanjanja endogenih steroida iz FCS

Endogeni steroidi uklonjeni su iz FCS adsorpcijom za aktivni uglj pretretiran dekstranom [Dang i Lowik, 2005]. Suspenzija 0,25% aktivnog uglja (Norit A, Serva, Heidelberg, Germany) i 0,025% dekstrana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) inkubirana je u baznoj sredini (0,01 M Tris-HCl pH 8,0) na magnetnoj mešalici preko noći na 4 °C. Aktivni uglj odvojen je centrifugiranjem 10 min / 3000 rpm (centrifuga Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany). Preko taloga aktivnog uglja naliven je FCS u odnosu 100 mL seruma na 1 g aktivnog uglja. Sadržaj je dobro promešan i inkubiran 1 h u vodenom kupatilu na 45 °C. Nakon inkubacije serum je odvojen od taloga aktivnog uglja centrifugiranjem 5 min / 3000 rpm / 10 °C, dok se nije dobio bistar supernatant. Supernatant je pažljivo dekantovan, profiltriran kroz filter papir i 0,2 µm filter, alikvotiran i čuvan na -20 °C do upotrebe.

3.1.2. Tretman HTR-8/SVneo ćelija steroidnim hormonima i antagonistima

U ovom radu ispitan je uticaj steroidnih hormona progesterona (P₄, Galenika AD, Beograd, Srbija), testosterona (TE, Galenika AD, Beograd, Srbija) i 17-β estradiola (E₂, Galenika AD, Beograd, Srbija), kao i sintetskog glukokortikoida deksametazona (DEX, Galenika AD, Beograd, Srbija) na vijabilnost ćelija i ekspresiju galektina-1, -3 i -8 u HTR-8/SVneo ćelijama i kondicioniranim ćelijskim medijumima. Pored toga, paralelno je praćen uticaj antagonista steroidnih receptora: 1) mifepristona (RU486, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), sintetskog steroidnog antagonista sa parcijalnom agonističkom aktivnošću, koji se vezuje za PR, GR, mineralokortikoidni receptor i androgeni receptor; 2) flutamida (F, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) antagonista androgenog receptora i 3) i fulvestranta (I, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), antagonista ER. Osnovni rastvori svih ispitivanih supstanci koncentracije 1 mM pripremljeni su u apsolutnom etanolu, a daljim razblaživanjem u medijumu za steroide pripremljena su radna razblaženja od 10 i 1000 nM (uz finalnu koncentraciju etanola < 0,1%). Kao kontrola (K) u eksperimentima, ćelije su gajene samo u medijumu za steroide sa dodatkom odgovarajuće količine rastvarača (< 0,1% etanola).

Za pripremu ćelijskih lizata za Western blot i *real-time* PCR analizu 1x10⁶ ćelija gajeno je u medijumu za steroide do postizanja subkonfluentnosti (~50-60%). Po

uklanjanju medijuma, ćelije su isprane toplim 0,05 M fosfatnim puferom, pH 7,2 (PBS). Ćelije su dalje inkubirane u prisustvu P₄, DEX, RU486, TE, F, E₂ i I u koncentracijama 10 nM i 1000 nM sledećih 48 sati, uz odgovarajuću kontrolu. Nakon isticanja inkubacionog perioda, ćelijski medijumi su sakupljeni, centrifugirani na 200 g, alikvotirani i sačuvani za analizu sekretoma. Ćelije su podignute sa podloge tripsinskom digestijom, isprane u PBS i lizirane za analizu proteina i iRNK.

3.2. Određivanje koncentracije steroidnih hormona radioimunotestom (RIA)

Koncentracija P₄, kortizola, TE i E₂ određena je komercijalnim testovima (RIA progesteron (PEG), RIA kortizol (CT), RIA testosteron (CT) i RIA estradiol (CT), INEP, Beograd, Srbija). Koncentracija steroidnih hormona određena je u FCS pre i posle tretiranja aktivnim ugljem, kako bi se utvrdila efikasnost uklanjanja endogenih steroida. U kondicioniranim ćelijskim medijumima netretiranih HTR-8/SVneo ćelija koncentracija steroidnih hormona je određivana da bi se utvrdilo da li ove ćelije sintetizuju steroidne hormone.

3.3. Antitela

Imunohemijska detekcija omogućena je primenom odgovarajućih antitela, specifičnih za dati protein. Pregled korišćenih primarnih antitela dat je u Tabeli IV.

Tabela IV Pregled korišćenih primarnih antitela.

Primarno antitelo	Tip antitela	Primena	Proizvođač
anti-galektin-1	poliklonsko	imunoblot ELISA test	INEP, Beograd, Srbija
anti-galektin-1	poliklonsko	imunoblot: 1 µg/mL (dot blot, ćelijski lizati) 2 µg/mL (kondicionirani medijumi)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
anti-galektin-3	poliklonsko	imunoblot: 1 µg/mL (ćelijski lizati) 2 µg/mL (kondicionirani medijumi)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
anti-galektin-8	poliklonsko	imunoblot: 1 µg/mL (ćelijski lizati) 2 µg/mL (kondicionirani medijumi)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
anti-β-aktin	poliklonsko	imunoblot: 1/500 (ćelijski lizati)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

Kao sekundarna antitela korišćena su biotinizirana kozija anti-kunić IgG i kunićeva anti-koza IgG antitela (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ili kozija anti-kunić antitela direktno obeležena peroksidazom (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

3.4. Analiza ekspresije gena za galektine-1, -3 i -8 u HTR-8/SVneo ćelijama

3.4.1. Postupak izolovanja RNK

Za analizu ekspresije gena za galektin-1, -3 i -8 HTR-8/SVneo ćelije su lizirane u TRIreagent (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). U 1 mL TRIreagenta lizirano je do 1×10^7 ćelija. Lizati su do izolovanja RNK čuvani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ukupna ćelijska RNK je izolovana neposredno pre sinteze komplementarnog lanca DNK (cDNK), guanidintiocijanatom/fenol/hloroformskom ekstrakcijom [Chomczynski, 1993]. Metoda se zasniva na različitoj raspodeli RNK, DNK i proteina. Po dodatku hloroforma na ćelijski lizat u TRIreagentu, RNK se izdvaja u vodenoj fazi, dok DNK ostaje u interfazi, a proteini u organskoj fazi. RNK je dalje izdvojena taloženjem 2-propanolom i ispiranjem u 70% etanolu. Talog RNK je zatim rastvoren u destilovanoj vodi. Koncentracija izolovane RNK određena je spektrofotometrijski merenjem apsorbance na 260 nm, a čistoća izolovane RNK određena je na osnovu odnosa izmerenih apsorbanci na 260 i 280 nm, pri čemu je poželjno da je $A_{260}/A_{280} > 1,7$. Spektrofotometrijska merenja na 260 i 280 nm izvršena su na aparatu NanoVue (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden).

3.4.2. Sinteza cDNK

Komplementarni lanac DNK sintetisan je iz 2 μg ukupne RNK, korišćenjem 0,2 μg *random hexamer* prajmera, dNTP u koncentraciji po 2,5 μM i 200 U RevertAid reverzne transkriptaze (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Uspešnost reverzne transkripcije proverena je RT-PCR reakcijom za konstitutivno eksprimirani gen.

3.4.3. Kvantitativna PCR analiza (*real-time PCR*)

Kvantitativna analiza iRNK izvršena je pomoću *real-time PCR* metode. Sekvence prajmera za galektine i β -aktin su opisane u literaturi i date su u Tabeli V [Thijssen i sar., 2008].

Tabela V Prajmeri korišćeni u *real-time PCR* eksperimentima (*SYBR Green* tehnika).

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
Gal-1 F	5'-TGCAACAGCAAGGACGGC-3'
Gal-1 R	5'-CACCTCTGCAACACTTCCA-3'
Gal-3 F	5'-CAGAATTGCTTTAGATTTCAA-3'
Gal-3 R	5'-TTATCCAGCTTTGTATTGCAA-3'
Gal-8 F	5'-CTTAGGCTGCCATTCGCT-3'
Gal-8 R	5'-AAGCTTTTGGCATTGCA-3'
β -aktin F	5' -GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3 '
β -aktin R	5' -CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3 '

F = *forward* prajmer; R = *reverse* prajmer

Reakciona smeša sastojala se od: 100 ng cDNK (1 μ L RT smeše), 5 μ L 2x KAPATM SYBR[®]288 Fast qPCR Universal Master Mix (Kappa Biosystems, Boston, MA, USA) i gen-specifičnih prajmera (Applied Biosystems, Boston, MA, USA) u finalnoj koncentraciji 0,4 μ M. PCR reakcija je izvođena na aparatu 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Boston, MA, USA), uz dvostepeni protokol:

1. 10 min / 95 °C – aktivacija polimeraze
2. 50 ciklusa:
 - 15 s / 95 °C – denaturacija
 - 1 min / 60 °C – aniling

Prethodno je koncentracija prajmera pri kojoj se postiže optimalna efikasnost PCR reakcije određena serijskim desetstrukim razblaživanjem prajmera, na osnovu standardne krive $Ct = f(\log_{10}(\text{faktor razblaženja}))$. Nakon završetka svake PCR reakcije, dobijeni produkti su podvrgnuti analizi krive topljenja, kako bi se pokazalo prisustvo jednog produkta reakcije, odnosno potvrdila specifičnost reakcije.

Dobijeni podaci obrađeni su prema komparativnoj ddCt metodi [Livak i Schmittgen, 2001]. Količina iRNK ispitivanog gena (target) u tretiranim ćelijama, normalizovana je u odnosu na referentni gen (endo), a promena ekspresije ispitivanog gena izražena je kao relativna promena ekspresije iRNK u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije (kalibrator) [Livak i Schmittgen, 2001]. U ovom slučaju iRNK za galektin-1, -3 ili -8 predstavlja target, a β -aktin je uzet za referentni gen (Slika 13). Eksperimenti su ponavljani tri puta.

$$\text{relativna promena ekspresije iRNK} = 2^{-ddCt}$$

$$ddCt = (Ct \text{ target} - Ct \text{ endo})_{\text{tretirane ćelije}} - (Ct \text{ target} - Ct \text{ endo})_{\text{kontrola}}$$

Slika 13. Formule za izražavanje relativne promene genske ekspresije prema ddCt metodi. Ct (threshold cycle) – broj ciklusa u kome fluorescentni signal nastalog PCR produkta prevazilazi zadati bazalni signal (modifikovano prema Livak i Schmittgen, 2001).

3.5. SDS-PAGE i Western blot

Prisustvo galektina-1, -3 i -8 u ćelijskim lizatima i kondicioniranim medijumima detektovano je primenom natrijum dodecilsulfat poliakrilamidne gel elektroforeze (SDS-PAGE) i Western blota. Elektroforeza je izvedena na diskontinuiranom poliakrilamidnom gelu, sa 4% gelom za koncentrovanje i 12,5% gelom za razdvajanje, pri redukujućim uslovima i uz denaturaciju proteina u prisustvu SDS, na 100 °C u trajanju od 5 minuta [Laemmli, 1970]. Korišćen je pufer za uzorke sledećeg sastava: 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-ME, 0,1% bromfenol plavo. HTR-8/SVneo ćelije (6×10^6 ćelija) lizirane su u 1 mL pufera za uzorke, dok su ćelijski medijumi mešani sa puferom za uzorke u odnosu 2:1. Elektroforeza je izvedena na sistemu za elektroforezu Mini-PROTEAN[®] 3 Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Razdvajanje proteina izvedeno je pri konstantnom naponu od 150 V i početnoj jačini struje od 50 mA. Nakon završene elektroforeze gel je uravnotežen u puferu za blot (25 mM Tris, 192 mM glicin i 20% (v/v) metanol, pH 8,3). Transfer razdvojenih proteina sa poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu (pore 45 μ m, Protran[®], PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) izvršen je polusuvim elektrotransferom, na sistemu Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell

(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), pri konstantnom naponu od 15 V tokom 20 minuta. Molekulske mase razdvojenih proteina određene su na osnovu markera poznatih molekulskih masa (SDS-PAGE Molecular Weight Standards Broad Range, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

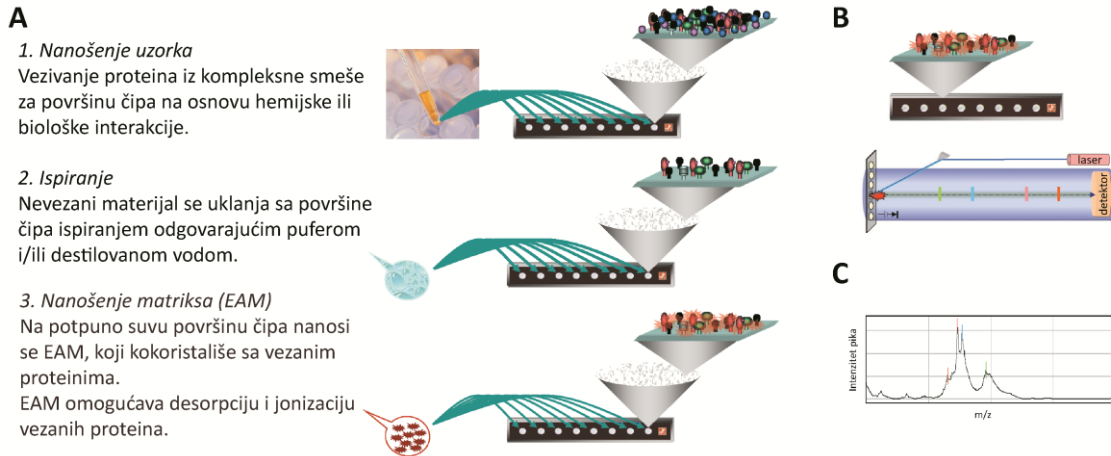
Nakon transfera, prisustvo proteina na membrani provereno je reverzibilnim bojenjem Ponceau-S (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Membrane su blokirane 30 minuta u 1% kazeinu, na sobnoj temperaturi. Inkubacija sa primarnim antitelima (antitela prema galektinu-1, -3 ili -8, odnosno antitela prema β -aktinu) pripremljenim u odgovarajućem razblaženju u 1% kazeinu, izvedena je preko noći na 4 °C. Posle ispiranja, membrana je inkubirana sa odgovarajućim sekundarnim, biotinizovanim, antitelima. Detekcija signala omogućena je primenom kompleksa avidin-biotin peroksidaza (ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) i bojenjem 3,3'-diaminobenzidinom (DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) u slučaju ćelijskih lizata, odnosno hemiluminiscentnom vizuelizacijom (Pierce ECL Western blot substrate, Thermo Scientific, Rockford, USA) kod analize ćelijskih medijuma.

3.6. SELDI-TOF masena spektrometrija

Za analizu sekretoma HTR-8/SVneo ćelija i karakterizaciju izolovanog galektina-1, odnosno izdvojenih IgG antitela iz seruma kunića korišćena je *surface-enhanced laser desorption and ionization time-of-flight* masena spektrometrija (SELDI-TOF MS).

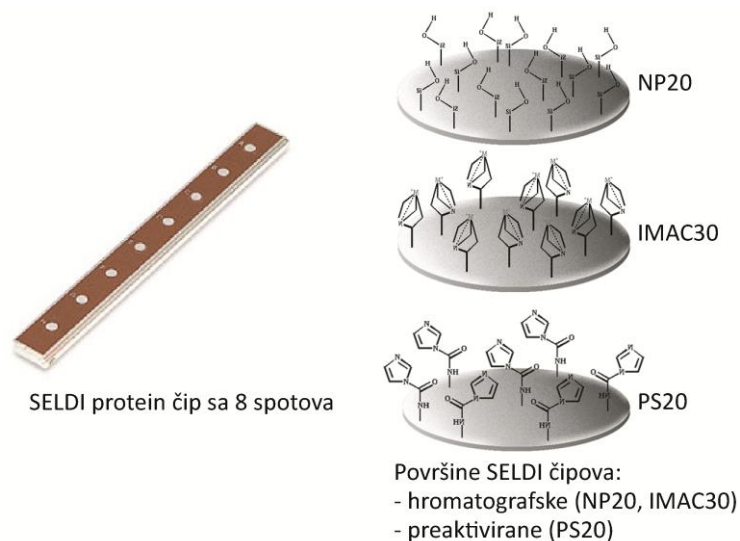
SELDI-TOF MS tehnologija predstavlja kombinaciju retencione hromatografije i masene spektrometrije – „hromatografija na čipu“ [Hutchens i Yip, 1993]. Ova metoda omogućava identifikaciju i profilisanje proteina iz kompleksne smeše, kakav je biološki materijal, bez prethodnog prečišćavanja uzorka (Slika 14). Uzorak može biti bilo koji biološki materijal (serum, urin, likvor, ćelijski lizat, kondicionirani ćelijski medijum). Proteinski čip sadrži osam tačaka (spotova) prečnika 2 mm, koje predstavljaju hemijski funkcionalnu površinu. U zavisnosti od karakteristika površine spota i korišćenih pufera sa jedne i karakteristika proteina sa druge strane, određeni proteini se zadržavaju na površini čipa, a ostatak se uklanja ispiranjem. Potom se dodaje matriks koji kokristališe sa uzorkom. Uloga matriksa je da apsorbuje energiju lasera. Laser dovodi do pobuđivanja protein-matriks kompleksa, koji je u kristalnom stanju, i njegovog protonovanja, čime se stvara molekularni jon analita. Protonovani molekularni jon $(M+H)^+$ kreće se u elektromagnetnom polju, a vreme za koje stiže do detektora,

srazmerno je njegovoj masi. Dobijeni SELDI-TOF maseni spektar predstavlja zavisnost intenziteta signala detektovanog protonovanog molekuskog jona (y -osa) od odnosa mase i naelektrisanja, m/z (x -osa).



Slika 14. Princip SELDI-TOF MS tehnologije. A) Priprema čipova. B) Jonizacija. C) Maseni spektar.

Pre nanošenja uzorka, priprema čipova, koja obuhvata aktiviranje, neutralizaciju i uravnoteženje vezujućim puferom, obavljena je prema uputstvu proizvođača. U ovom radu, korišćena su tri tipa čipova (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA): čip sa normalnom fazom NP20 (*Normal Phase ProteinChip*), metal-afinitetni čip IMAC30 (*Imobilized Metal Affinity Chromatography ProteinChip*) i čip sa preaktiviranom površinom PS20 (*Preactivated Surface ProteinChip*) (Slika 15).



Slika 15. SELDI čipovi i aktivne površine SELDI čipova korišćenih u ovom radu.

Na površini NP20 čipa nalaze se silikatne grupe, za koje se proteini vezuju preko hidrofilnih i naelektrisanih grupa serina, treonina i lizina. Uzorak se nanosi direktno na površinu čipa. Nakon sušenja i ispiranja nanosi se matriks.

Za površinu IMAC30 čipa proteini se vezuju koordinativnim vezama za odgovarajuće metalne jone. IMAC30 čip je preaktiviran sa 5 μL 0,1 M CuSO_4 po spotu. Nakon ispiranja destilovanom vodom, čip je neutralisan sa 5 μL 0,1 M natrijum acetata pH 4 i ponovo ispran destilovanom vodom. Pre nanošenja uzorka (5 μL po spotu), čip je ekvilibrisan puferom za vezivanje (PBS sa 0,5 M NaCl i 0,1% Triton X-100, pH 7). Uzorci su inkubirani u vlažnoj komori, 2 h, uz mućkanje 450 rpm (Titramax 100, Heildorph, Germany), na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacionog perioda, spot je ispran puferom za vezivanje, a zatim destilovanom vodom i osušen na vazduhu.

Epoksi grupe na površini PS20 čipa reaguju sa amino grupama biomolekula, pri čemu se stvaraju kovalentne veze. Time se za preaktiviranu površinu čipa čvrsto vezuju molekuli (kao što su npr. antitela), za koje se potom nekovalentnim interakcijama vezuju molekuli od interesa iz ispitivanog biološkog uzorka. U ovom radu, za površinu PS20 čipa vezivana su anti-galektin-1 antitela (5 μL po spotu) u vlažnoj komori, na 4 °C preko noći. Nakon ispiranja i blokiranja, naneti su uzorci – izolovani placentni galektin-1, HTR-8/SVneo ćelijski lizat ili kondicionirani medijumi HTR-8/SVneo ćelija. Uzorci su inkubirani u vlažnoj komori, dva sata uz mućkanje na orbitalnoj platformi. Nakon ispiranja PBS, a zatim destilovanom vodom, čipovi su osušeni na vazduhu.

Kao matriks korišćena je sinapinska kiselina (SPA, 3,5-dimetoksi-4-hidroksicinaminska kiselina). Zasićeni rastvor SPA, sveže pripremljen u 50% acetonitrilu i 0,5% trifluorosirćetnoj kiselini dvostruko je razblažen u 50% acetonitrilu/0,5% trifluorosirćetnoj kiselini i korišćen je kao radni rastvor. Po 1 μL radnog rastvora SPA nanet je na svaki spot po dva puta, pri čemu je između dva nanošenja čip ostavljen da se potpuno osuši. Nakon potpunog sušenja na vazduhu, čip je pripremljen za očitavanje.

Priprema čipova i očitavanje vršeni su istog dana. Čipovi su očitani u ProteinChip Reader, Series 4000, Personal edition (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Masena analiza izvedena je pri energiji lasera od 6000 nJ, sa 8815 laserskih impulsa po spotu. Spektri su obuhvatali opseg masa između 2,5 i 200 kDa, sa fokus masom od 15 kDa. Podaci su dobijeni usrednjavanjem 80 spektara po spotu. Eksterna kalibracija

ProteinChip Reader-a urađena je na osnovu ProteinChip All-in-one protein Standards II. Dobijeni spektri su analizirani programom Ciphergen Express Software 3.0 (BioRad, Hercules, CA, USA). Nakon završenog očitavanja, bazna linija je korigovana na svim spektrima. Proteinski profili su normalizovani prema *total ion current* između 2500 and 70000 m/z. Pikovi su detektovani automatski, za zadati odnos signala i šuma (*signal to noise ratio, S/N*) > 3. Za kvantitativnu analizu uzet je intenzitet pika ili udeo ispod površine pika u odnosu na ukupnu površinu.

3.7. Funkcionalni *in vitro* testovi

3.7.1. Test ćelijske vijabilnosti

Uticao steroidnih hormona i odgovarajućih antagonista na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija ispitan je MTT testom [Hanisch i sar., 1993]. Pri datim uslovima, žuti MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) biva redukovano posredstvom NAD(P)H zavisnih oksidoreduktaza u nerastvoran formazan, ljubičasto-plave boje. Dodatkom 2-propanola, solubilizuju se ćelijske membrane i nastali formazan. Intenzitet boje nastalog rastvora direktno je srazmeran broju živih ćelija.

Za MTT test, 2×10^4 ćelija u 100 μL medijuma za steroide je zasejano po bunaru u ploču od 96 mesta i ostavljeno da adherira preko noći. Medijum je potom uklonjen i ćelije su isprane toplim PBS. Ćelije su tokom narednih 48 sati gajene u medijumu za steroide u prisustvu steroidnih hormona (P_4 , TE, E_2), DEX ili odgovarajućih steroidnih antagonista (RU486, F i I) u koncentracijama od 10 nM i 1000 nM ili samo u medijumu za steroide sa dodatkom rastvarača (K). Po isteku inkubacionog perioda, medijum je uklonjen i ćelije su isprane toplim PBS. Zatim je dodato po 100 μL rastvora MTT (1 mg/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) rastvorenog u 5% sFCS/PBS. Nakon inkubacije od dva sata na 37 °C, rastvor MTT je uklonjen, i dodato je po 100 μL 2-propanola (Chemapol, Prague, Czech Republic). Formirani kristali formazana su rastvoreni kratkotrajnim intenzivnim mućkanjem neposredno pre merenja apsorbance na 540 nm (LKB Microplate reader, Vienna, Austrija). Eksperiment je ponavljan tri puta.

3.7.2. Test ćelijske migracije

Migratorna svojstva HTR-8/SVneo ćelija tretiranih E₂ ispitan je u testu ćelijske migracije, primenom *wound healing* metode. HTR-8/SVneo ćelije su zasejane u ploču od 24 mesta, 3x10⁵ ćelija u 300 µL medijuma za steroide po otvoru i inkubirane pri standardnim uslovima. Nakon postizanja konfluentnosti, medijum je uklonjen i ćelije su isprane toplim PBS. Sterilnim plastičnim nastavkom po sredini bunara ravnomerno je povučena linija čime je narušen sloj adherentnih ćelija. Ćelije koje su pritom odlepljene su isprane toplim PBS. Neposredno potom, odabrana mesta na kojima je linija povučena su markirana i fotografisana (t = 0). Ćelije su dalje inkubirane u prisustvu E₂ (10 i 1000 nM) ili samo u medijumu za steroide (K). Nakon 24 h, odabrana mesta su ponovo fotografisana (t = 24). Površine „zaraščivanja” ozlede ćelijskog sloja su merene pre dodatka E₂ i nakon inkubacije od 24 h, a potom je izračunat njihov odnos. Izračunata vrednost odnosa za kontrolne uzorke uzeta je kao 100%, a vrednosti ćelija tretiranih E₂ upoređene su sa kontrolom. Eksperimenti su ponovljeni tri puta.

3.7.3. Test ćelijske invazije

Uticaj E₂ na invazivna svojstva HTR-8/SVneo ćelija ispitan je u testu ćelijske invazije. Test ćelijske invazije izveden je na Matrigelu[®] prema ranije opisanoj proceduri [Librach i sar., 1991].

Odgovarajući broj umetaka (inseta) za ćelijsku kulturu sa polikarbonatnom membranom i porama promera 8 µm (Millipore) postavljen je u ploču od 24 mesta. Na gornju stranu svakog umetka ravnomerno je razliveno po 10 µL Matrigela[®] (BD Biosciences, Bedford, MA, USA), pripremljenog u koncentraciji od 2,5 mg/mL u osnovnom RPMI 1640 medijumu bez fenol crvenog, a zatim ostavljeno 30 min na 37 °C kako bi Matrigel[®] gelirao.

Po umetku, sa gornje strane membrane, dodato je po 1x10⁵ ćelija u 200 µL medijuma bez (K) ili u prisustvu E₂ (10 nM ili 1000 nM). U dno bunarića ploče od 24 mesta postavljeno je po 500 µL odgovarajućeg medijuma, ali bez ćelija. Eksperimenti su ponavljani najmanje tri puta, sa po dva inserta za kontrolu, odnosno svaki od tretmana. Po završetku inkubacije u trajanju od 24 h na 37 °C, medijum sa gornje strane umetka je uklonjen. Gornja površina membrane umetka je pažljivo prebrisana

pamučnim štapićem kako bi se uklonio Matrigel® i ćelije koje nisu ušle u membranu. Inerti su fiksirani sa po 500 µL ledenog acetona/metanola (1:1, sveže pripremljen), 10 min na sobnoj temperaturi. Membrane su odvojene skalpelom. Ćelije koje su zadržane u porama ili sa donje strane membrane obojene su Gimzom i izbrojane sa cele površine membrane pod svetlosnim mikroskopom (Reichert-Jung Microscope/Leica DC150 Digital Camera System).

3.8. Izolovanje galektina-1 iz placente trećeg trimestra

3.8.1. Priprema placentnog ekstrakta

Galektin-1 izolovan je iz sveže placente trećeg trimestra [Hirabayashi i Kasai, 1984]. Neposredno nakon porođaja, tkivo placente je čuvano i transportovano na ledu, u PBS sa 0,25 mM fenilmetan sulfonil fluorida (PMSF, Fluka, Buchs, Switzerland) u cilju inhibiranja proteaza. Po odvajanju pupčanika i membrana, tkivo je intenzivno isprano od krvi pod mlazom tekuće vode, a potom u EDTA-MEPBS/PI puferu (PBS pH 7,2 sa 2 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Germany), 10 mM 2-merkaptoetanol (2-ME, ICN Biomedicals Inc, Aurora, OH, USA) i koktelom inhibitora proteaza (PI, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)). Tkivo je mehanički usitnjeno, a potom homogenizovano (Tri-R STR-R Model S63S, TRI-R Instruments Inc, Rockville NY, USA), na 4 °C.

Galektin-1 je izdvojen iz ćelijskog peleta laktoznom ekstrakcijom u redukujućim uslovima. Po centrifugiranju tkivnog homogenata (30 min / 6000 rpm, na 10 °C), supernatant (citosolna frakcija) je dekantovan, a talog (ćelijski pelet, mase oko 300 g) je kvantitativno prenet u staklenu bocu. Ćelijski talog je inkubiran u prisustvu 0,1 M laktoze (Lac, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) rastvorene u EDTA-MEPBS/PI 3 h na magnetnoj mešalici, na 4 °C. Nakon završetka ekstrakcije, sadržaj je centrifugiran 30 min / 6000 rpm na 10 °C. Supernatant je sačuvan, a sa talogom su ponovljena još dva ciklusa ekstrakcije. Sakupljeni supernatanti iz sva tri ciklusa ekstrakcije su spojeni, čime je pripremljen placentni ekstrakt iz koga je Lac uklonjena dijalizom u 10 L EDTA-MEPBS-a, preko noći na 4 °C. Placentni ekstrakt je zatim koncentrovan na ultrafiltracionom sistemu AMICON 8400 (EMD Millipore Billerica, MA, USA), na membrani PM10 (EMD Millipore Billerica, MA, USA), koja zadržava molekule čija je masa iznad 10 kDa. Po završetku koncentrovanja, u placentnom ekstraktu je određena koncentracija proteina, metodom po Bradfordu, uz goveđi serumski albumin (BSA,

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kao standard proteina [Bradford, 1976]. Dobijeni ekstrakt je razliven i čuvan na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.8.2. Afinitetna hromatografija i izolovanje galektina-1

Galektin-1 prečišćen je iz placentnog ekstrakta primenom afinitetne hromatografije, prema ranije opisanom postupku, uz izvesne modifikacije [Hirabayashi i Kasai, 1984; Janković, 1989]. Metoda se zasniva na reverzibilnoj interakciji između liganda kovalentno vezanog za matriks, i molekula koji se prečišćava iz kompleksne smeše. U ovom radu, galektin-1 je prečišćen korišćenjem Lac imobilisane za afinitetni matriks Sepharose 4B (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden).

Vezivanje Lac za afinitetni matriks izvedeno je prema proceduri opisanoj u literaturi [Fornstedt i Porath, 1975]. Sepharose 4B je aktivirana divinilsulfonom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), u baznoj sredini (0,5 M karbonatni pufer pH 11) na sobnoj temperaturi. Vezivanje Lac 20% (w/v) za aktiviranu Sepharose 4B vršeno je u 0,5 M karbonatnom puferu pH 10, preko noći, na sobnoj temperaturi. Slobodna mesta blokirana su 2-ME u 0,5 M bikarbonatnom puferu pH 8,5 dva sata na sobnoj temperaturi. Nakon svakog od navedenih koraka, Sepharose 4B je intenzivno ispirana destilovanom vodom na staklenom sinteru. Lac-Sepharose 4B je napakovana na kolonu zapremine 20 mL, kolona je uravnotežena u PBS i čuvana na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do upotrebe.

Neposredno pre upotrebe, kolona je uravnotežena u EDTA-MEPBS puferu, pH 7,2. Na kolonu je naneto 16 mL placentnog ekstrakta, a vezivanje galektina-1 za imobilisanu Lac odvijalo se preko noći na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sutradan, kolona je isprana u petostrukoj zapremini EDTA-MEPBS pufera, kako bi se uklonio nevezani materijal. Galektin-1 eluiran je sa kolone Gly-HCl puferom pH 2,5 pri protoku od 3 mL / 8 min. Sakupljane su frakcije od po 3 mL, a eluiranje je praćeno merenjem apsorbance na 280 nm (spektrofotometar Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Frakcije u kojima je vrednost apsorbance bila veća od 0,2 su spojene. Zatim su na AMICON 8400 sistemu, na membrani PM10 najpre isprane u PBS kako bi se uklonio 2-ME, a zatim koncentrovane. Na ovaj način je dobijen izolat placentnog galektina-1. U dobijenom izolatu, koncentracija proteina određena je metodom po Bradfordu. Prikupljeni galektin-1 čuvan je na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.8.3. Karakterizacija izolovanog galektina-1

3.8.3.1. Dot-imunoblot

Prisustvo galektina-1 u placentom ekstraktu i frakcijama eluiranim sa Lac-Sepharose 4B kolone potvrđen je dot blot testom. Na nitroceluloznu membranu, naneto je po 1 μ L uzorka u kojima je A_{280} bila veća od 0,2. EDTA-MEPBS pufer služio je kao slepa proba. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, membrane su blokirane u 3% rastvorom BSA 60 minuta na sobnoj temperaturi. Inkubacija sa poliklonskim anti-galektin-1 antitelima (1 μ g/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), vršena je preko noći, na 4 °C. Za procenu nespecifičnog vezivanja, inkubacija je vršena bez prisustva primarnih antitela, samo u 1% BSA. Nakon ispiranja, membrane su inkubirane sa sekundarnim biotinizovanim antitelima, 30 min na sobnoj temperaturi. Po ispiranju i inkubaciji sa ABC 30 min na sobnoj temperaturi, detekcija je izvršena bojenjem DAB.

3.8.3.2. SDS-PAGE na gradijentu gela i bojenje gela srebrom

Proteini neprečišćenog placentnog ekstrakta i izolovani galektin-1 razdvojeni su primenom SDS-PAGE na gradijentu gela 5-20%, uz 4% gel za koncentrovanje i pri redukujućim uslovima. Uzorci su pripremljeni u puferu za uzorke (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-ME, 0,1% bromfenol plavo), a zatim su proteini denaturisani na 100 °C tokom 5 min. Nakon elektroforeze, razdvojene proteinske trake detektovane su bojenjem srebrom korišćenjem komercijalnog kita Bio-Rad Silver Stain (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

3.8.3.3. Ispitivanje lektinskih svojstava izolovanog galektina-1

3.8.3.3.1. Test hemaglutinacije

Test hemaglutinacije je izveden sa tripsinizovanim eritrocitima kunića, na staklenoj površini, u redukujućim uslovima. Eritrociti kunića isprani su iz pune krvi fiziološkim rastvorom (0,9% NaCl). Suspenzija eritrocita (4% u 0,9% NaCl) pomešana je sa 1% tripsinom (Sigma, St Louis, MO, USA) u zapreminskom odnosu 10:1. Reakcija tripsinizacije izvedena je 1h na 37 °C (u vodenom kupatilu), nakon čega su eritrociti isprani tri puta u 0,9% NaCl. U testovima hemaglutinacije i inhibicije

hemaglutinacije korišćena je 2% radna suspenzija tripsinizovanih eritrocita u 0,9% NaCl.

Test hemaglutinacije izveden je na staklenoj površini, na sobnoj temperaturi, u prisustvu ditiotreitola (DTT, ICN Biomedicals Inc, Aurora, OH, USA) kao redukujućeg agensa. Radni rastvori izolovanog galektina-1 i Lac (0,2 M) pripremljeni su u PBS kome je dodat DTT (5 mM). U testu inhibicije hemaglutinacije izolovani galektin-1 je preinkubiran u prisustvu Lac. Testovi hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije sprovedeni su prema šemi prikazanoj u Tabeli VI.

Tabela VI Šema izvođenja testova hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije.

	Slepa proba	Test hemaglutinacije	Test inhibicije hemaglutinacije
DTT (5 mM)	25 µL	12,5 µL	/
Galektin-1	/	12,5 µL	12,5 µL
Lac (0,2 M)	/	/	12,5 µL
2% suspenzija tripsinizovanih eritrocita	25 µL	25 µL	25 µL

3.8.3.3.2. Lektinski test na čvrstoj fazi

Lektinskim testom na čvrstoj fazi, u formi dot-imunoblota, ispitano je vezivanje galektina-1 za različite glikoproteine. Na nitroceluloznu membranu naneti su glikoproteini (3 µg): asijalofetuin (ASF, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), komercijalna smeša komponenti ECM Matrigel[®], kolagen tipa I (Col I, BD Biosciences, Bedford, MA, USA) i serumski fibronektin (sFN, BD Biosciences, Bedford, MA, USA). EDTA-MEPBS pufer služio kao slepa proba (Tabela VII).

Tabela VII Glikoproteini naneti na nitroceluloznu membranu za lektinski test na čvrstoj fazi

EDTA/MEPBS	ASF (1 mg/mL)	sFN (1mg/mL)	Col I (3,74 mg/mL)	Matrigel® (6,8 mg/mL)
1 µL	3x1 µL	3x1 µL	1 µL	0,5 µL

Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, nespecifično vezivanje blokirano je 3% rastvorom BSA dva sata na sobnoj temperaturi, uz mućkanje. Osnovni rastvori izolovanog placentnog galektina-1 (6 µg/mL) i Lac (0,4 M) pripremljeni su u EDTA-MEPBS puferu. Izolovani placentni galektin-1 (finalno 3 µg/mL) preinkubiran je jedan sat na sobnoj temperaturi sa različitim koncentracijama Lac (finalno 0-0,2 M) prema šemi datoj u Tabeli VIII. Ova razblaženja galektina-1/Lac dalje su inkubirana sa pojedinačnim membranama sa nanetim glikoproteinima preko noći na 4 °C, uz blago mešanje.

Tabela VIII Priprema radnih razblaženja izolovanog galektina-1 za lektinski test na čvrstoj fazi.

	Galektin-1/ 0 M Lac	Galektin-1/ 0,025 M Lac	Galektin-1/ 0,05 M Lac	Galektin-1/ 0,1 M Lac	Galektin-1/ 0,2 M Lac
EDTA/MEPBS	500 µL	437,5 µL	375 µL	250 µL	/
Lac (0,4 M)	/	62,5 µL	125 µL	250 µL	500 µL
Galektin-1 (6 µg/mL)	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

Nakon ispiranja, membrane su inkubirane sa primarnim anti-galektin-1 antitelima (1 µg/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) dva sata na sobnoj temperaturi, a zatim 30 min sa sekundarnim biotinizovanim anti-kunić IgG antitelima. Detekcija signala omogućena je primenom ABC i bojenjem DAB.

3.9. Priprema poliklonskih antitela prema galektinu-1

3.9.1. Postupak imunizacije kunića

Poliklonska antitela prema galektinu-1 proizvedena su imunizacijom kunića prečišćenim placentnim galektinom-1, koncentracije 470 µg/mL. Kunić (velika činčila, starost > 6 meseci, mužjak) imunizovan je emulzijom galektina-1 (700 µg) i kompletnog Freund-ovog adjuvansa (CFA), u zapreminskom odnosu 1:1, intramuskularno, na više mesta. Postupak imunizacije je ponovljen još dva puta, u intervalima od dve nedelje, sa emulzijom galektina-1 (700 µg) i nekompletnog Freund-ovog adjuvansa u zapreminskom odnosu 1:1 [Clerch i sar., 1987; Čuperlović i sar., 1995].

Sedam dana nakon poslednjeg aplikovanja, izvađena je krv iz ušne vene kunića. Nakon vađenja, krv je ostavljena 60 minuta na 37 °C, a zatim preko noći zatim na 4 °C da koaguliše. Serum je izdvojen centrifugiranjem 15 minuta / 2000 rpm i testiran na prisustvo anti-galektin-1 antitela dvostrukom imunodifuzijom u gelu. Nakon pozitivne reakcije, krv je ponovo uzorkovana posle dva dana, a zatim još tri puta u intervalima od 30 dana. Po odvajanju, serum je alikvotiran u staklene bočice i čuvan na -20 °C.

3.9.2. Dvostruka imunodifuzija u gelu

Reaktivnost dobijenog anti-galektin-1 antiseruma testirana je dvostrukom imunodifuzijom u gelu agara. U staklenu Petri šolju razliven je 1% (w/v) gel agara u 0,1 M veronalnom puferu pH 8,6. U gelu debljine 2 mm formirani su otvori prečnika $\varphi = 3$ mm. U centralni otvor naneto je 10 µL kunićevog antiseruma. U okolne bunariće naneto je po 10 µL placentnog ekstrakta i izolovanog galektina-1. Petri šolja je ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi i rezultat je očitao sutradan.

3.9.3. Izdvajanje antitela kaprilnom kiselinom

U umereno kiseloj sredini, kaprilna kiselina taloži većinu proteina seruma, izuzev IgG molekula, što predstavlja jednostavan način za dobijanje prečišćenih imunoglobulina [McKinney i Parkinson, 1987; Steinbuch i Audran, 1969].

Uz mešanje na magnetnoj mešalici, na 15 mL kunićevog seruma dodata je jedna zapremina (15 mL) 0,06 M acetatnog pufera pH 4, a pH smeše je održavan na 4,8.

Kaprilna kiselina (Merck, Darmstadt, Germany) dodata je kap po kap (0,08 mL kaprilne kiseline po mL kunićevog seruma). Sadržaj je ostavljen na magnetnoj mešalici, 30 minuta. Precipitirani proteini odvojeni su centrifugiranjem 15 minuta / 4500 rpm / 10 °C. Talog je odbačen, a supernatant profiltriran kroz filter papir. Na AMICON 8400 sistemu supernatant je ispran u PBS i koncentrovan.

Koncentracija antitela određena je biuretskom metodom [Gornall i sar., 1949]. Koncentrovana antitela profiltrirana su kroz 0,2 µm filter i čuvana na -20 °C.

3.9.4. Karakterizacija dobijenih antitela prema galektinu-1

Čistoća antitela prema humanom placentnom galektinu-1, izdvojenih iz kunićevog seruma kaprilnom kiselinom, proverena je primenom SELDI-TOF MS i imunoelektroforeze.

Za SELDI-TOM MS analizu korišćeni su čipovi sa normalnom fazom, NP20. Na spot čipa naneto je 5 µL prečišćenih antitela. Nakon sušenja na vazduhu, spot je ispran tri puta PBS, i ostavljen da se suši na vazduhu. Nakon dodatka matriksa, čip je očitao kao što je opisano (poglavlje 3.6).

Uzorak prečišćenog IgG prema galektinu-1 nanet je na 1% gel agara. Imunoelektroforeza je izvedena pri naponu od 100 V i jačini struje 20 mA u veronalnom puferu pH 8,6. Nakon završetka elektroforeze u žljeb gela, paralelno sa pravcem pružanja električnog polja, odnosno pravcem kretanja proteina tokom elektroforetskog razdvajanja, nanet je ovčiji anti-kunić IgG (100 µL). Nakon inkubacije od 24 h na +4 °C, detektovana je precipitaciona linija koju je formirao kompleks kunićev anti-galektin-1 IgG/ovčiji anti-kunić IgG.

Specifičnost antitela proverena je Western blot analizom na HTR-8/SVneo ćelijskim lizatima. Antitela su korišćena u tri različite koncentracije: 5, 10 i 25 µg/mL. Signal je detektovan DAB bojenjem.

3.9.5. ELISA test za određivanje galektina-1

3.9.5.1. Obeležavanje antitela peroksidazom

Kovalentno vezivanje peroksidaze iz rena (HRPO) za IgG izvršeno je perjodatnom oksidacijom [Nakane i Kawaoi, 1974]. Princip metode je sledeći: nakon

oksidacije perjodatom, ugljenohidratne grupe na molekulu peroksidaze formiraju Šifove baze sa amino grupama IgG molekula, a zatim se redukcijom Šifove baze natrijum borhidridom formira stabilni konjugat.

Liofilizovana peroksidaza iz korena rena (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) rastvorena je u destilovanoj vodi (4 mg/mL) i aktivirana natrijum perjodatom (0,18 M) tokom 20 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku, uz neprekidno mešanje. Aktivirana peroksidaza izdvojena je na Sephadex G-25 koloni (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) uz eluiranje 0,01 M acetatnim puferom, pH 4,0. Obojene frakcije su spojene i pH je podešen dodatkom 0,2 M NaOH na 9,5. Anti-galektin-1 antitela koncentracije 10 mg/mL, pripremljena u 0,1 M karbonat/bikarbonatnom puferu pH 9,5 dodata su aktiviranoj peroksidazi. Smeša enzim-antitela, čiji je pH podešen na 9,5, inkubirana je na sobnoj temperaturi u mraku, uz neprekidno mešanje. Nakon četiri sata, smeši je dodat natrijum borhidrid i inkubacija je nastavljena još jedan sat pri istim uslovima.

Obeleženim antitelima (At/HRPO konjugat) dodat je glicerol (finalno 50% u konjugatu), BSA (finalno 10 mg/mL) i mertiolat (finalno 0,01%). Konjugat je čuvan na -20 °C.

3.9.5.2. Imobilizacija antitela za polistirensku ploču

Polistirenska mikrotitarska ploča sa 96 mesta MaxiSorp™ (Thermo Scientific Nunc A/S, Roskilde, Denmark) obložena je kunićevim poliklonskim anti-galektin-1 antitelima (1 ili 5 µg antitela po otvoru). Antitela su preaktivirana Gly-HCl puferom, razblažena u PBS i razlivena u mikrotitarsku ploču. Adsorpcija antitela je izvršena preko noći, na 4 °C. Nakon ispiranja, nevezana mesta na ploči su blokirana u 1% BSA tokom 2 sata na 37 °C. Ploča je osušena u vakuum sušnici preko noći, a zatim čuvana na 4 °C do upotrebe.

3.9.5.3. Određivanje koncentracije galektina-1 u humanom serumu

Uzorci seruma razblaženi su 1:201 (5 µL seruma u 1 mL pufera) u puferu (3% BSA, 0,05% Tween 20 u PBS). Po 100 µL razblaženja seruma naneto je u mikrotitarsku ploču obloženu poliklonskim anti-galektin-1 antitelima (1 µg po otvoru). Uzorci su inkubirani dva sata na sobnoj temperaturi, uz blago mućkanje (150 rpm). Nakon završetka inkubacije, ploča je isprana 3 x 300 µL (0,05% Tween u PBS). Po 100 µL

konjugata At/HRPO (1:250) dodato je u svaki otvor i ploča je inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi, uz blago mućkanje (150 rpm) na orbitalnoj platformi. Višak nevezanih obeleženih antitela uklonjen je ispiranjem (na isti način kao i nakon prve inkubacije). U svaki otvor dodato je po 100 μ L supstrata (H_2O_2 /TMB). Nakon 15 minuta enzimska reakcija je zaustavljena dodatkom po 100 μ L 0,1 M HCl. Apsorbanca razvijene boje, proporcionalna je sadržaju galektina-1 u uzorku, i izmerena je na 450 nm na ELISA čitaču.

3.10. Statistička analiza

Za statističku obradu dobijenih podataka korišćeni su programi Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), Statistical Software Program Version 5.0 (Primer of Biostatistics, McGraw-Hill Companies Inc., New Jersey, USA) i MedCalc for Windows, Version 11.3.0.0. (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija). Za testiranje značajnosti između različitih grupa, u zavisnosti od distribucije vrednosti, primenjen je test analize varijanse (ANOVA), uz SNK *post-hoc* test, odnosno Kruskal-Wallis neparametarski test. Statistički značajnim smatrane su razlike za koje je p vrednost bila $< 0,05$.

Rezultati

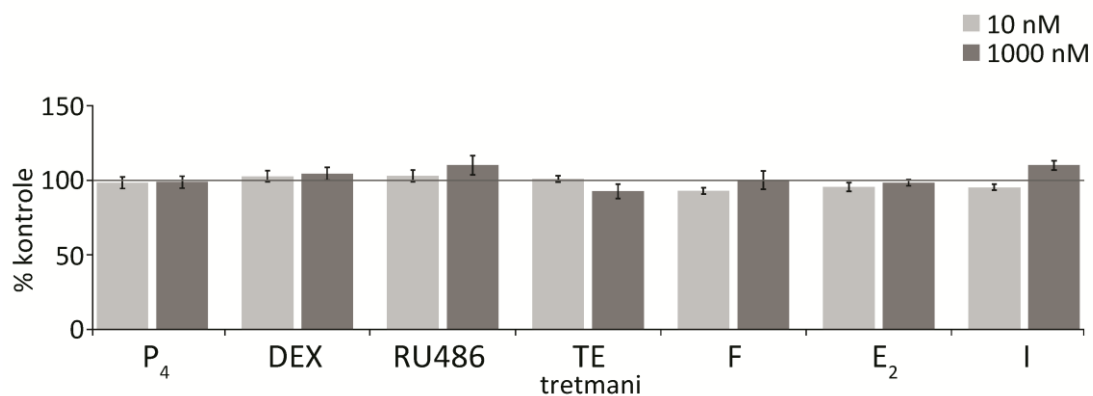
4.1. Steroidni hormoni i ekstravilusni trofoblast

Cilj ovog rada je bio da se ispita uticaj steroidnih hormona i steroidnih antagonista na ekspresiju galektina-1, -3, i -8 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo. Sintezu steroidnih hormona P_4 i E_2 *in vivo* vrši STB, ali i neke ćelijske linije trofoblastnog porekla mogu sintetisati steroidne hormone *in vitro*. Stoga je najpre ispitano da li ova ćelijska linija produkuje neki od steroidnih hormona *per se*.

Analizom kondicioniranih ćelijskih medijuma HTR-8/SVneo ćelija RIA testovima, pokazano je da ova ćelijska linija ne sintetiše P_4 kao ni E_2 . Pored toga, u kondicioniranim medijumima nisu detektovani ni androgeni hormoni, kao ni kortikosteroidi. Kako su androgeni hormoni prekursori za sintezu estrogena u placenti čoveka, takođe je ispitano da li HTR-8/SVneo ćelije mogu vršiti konverziju androgena u estrogene. Nakon tretiranja ćelija TE tokom 48 h, u kondicioniranim ćelijskim medijumima nije detektovan E_2 , što ukazuje da, pri datim eksperimentalnim uslovima, aromataza nije aktivna u ovoj EVT ćelijskoj liniji.

4.1.1. Uticaj steroidnih hormona i antagonista na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija

Kako je u ovom radu ispitivan efekat steroidnih hormona i antagonista na nivoe galektina-1, -3 i -8, najpre je ispitan njihov uticaj na ćelijsku vijabilnost, pri datim eksperimentalnim uslovima. Ćelije su tretirane tokom 48 h dodatkom medijumu odgovarajuće količine rastvarača (K) bez ili sa P_4 , DEX, RU486, TE, F, E_2 i I, pri pojedinačnim koncentracijama od 10 nM i 1000 nM, a efekat je praćen MTT testom. U odnosu na kontrolu (100%), stopa preživljavanja tretiranih ćelija kretala se od 92,7% za TE 10 nM do 110% za RU486 1000 nM i I 1000 nM, pri čemu dobijene razlike nisu bile statistički značajne. Pored toga, nije postojala ni statistički značajna razlika u preživljavanju između ćelija tretiranih steroidnim hormonima i odgovarajućim antagonistima (P_4 vs RU486, DEX vs RU486, TE vs F i E_2 vs I). Dobijeni rezultati pokazali su da, pri datim eksperimentalnim uslovima, preživljavanje ćelija EVT ne zavisi od uticaja steroidnih hormona niti odgovarajućih antagonista (Slika 16).



Slika 16. Efekat P₄, DEX, RU486, TE, F, E₂ i I (10 nM i 1000 nM) na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija. Vijabilnost ćelija merena je MTT testom, pri čemu je broj vijabilnih ćelija direktno srazmeran apsorbanci izmerenoj na 540 nm. Vrednosti za pojedinačne tretmane su predstavljene kao % u odnosu na kontrolu. Na dijagramu su predstavljene srednje vrednosti (%) ± SEM; n=18.

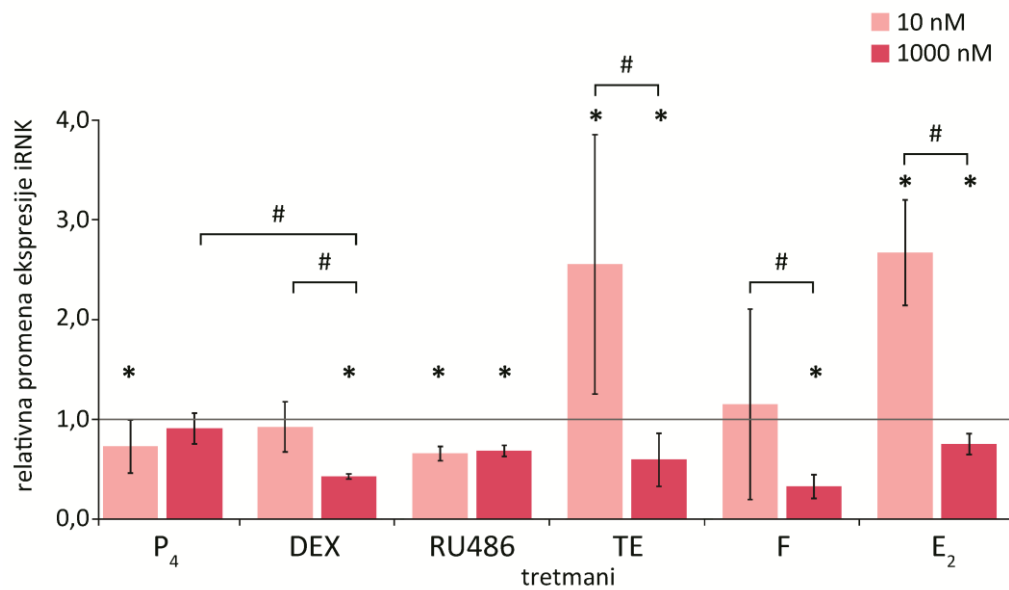
4.1.2. Efekat steroidnih hormona na ekspresiju i sekreciju galektina u trofoblastu *in vitro*

U ranijim radovima naše laboratorije pokazan je uticaj glukokortikoida i P₄ na galektin-1 u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji na proteinskom nivou, kao i galektinski profil ovih ćelija. U cilju daljeg ispitivanja mogućeg uticaja steroidnih hormona i njihovih antagonista na galektine prisutne u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji, ćelije su tretirane navedenim hormonima i odgovarajućim antagonistima tokom 48 h. U ovom radu njihov mogući uticaj na galektin-1, -3 i -8 praćen je paralelno na genskom i proteinskom nivou. Efekat na ekspresiju gena za galektine procenjen je na osnovu promena u nivou iRNK za *LGALS1*, 3 i 8, dok su na proteinskom nivou praćene promene nivoa galektina-1, -3 i -8 u ćelijama kao i promene u sekreciji galektina.

4.1.2.1. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na ekspresiju gena za galektin-1, -3 i -8 (*LGALS1*, *LGALS3* i *LGALS8*) u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo

4.1.2.1.1. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na ekspresiju gena za galektin-1 (*LGALS1*) u HTR-8/SVneo ćelijama

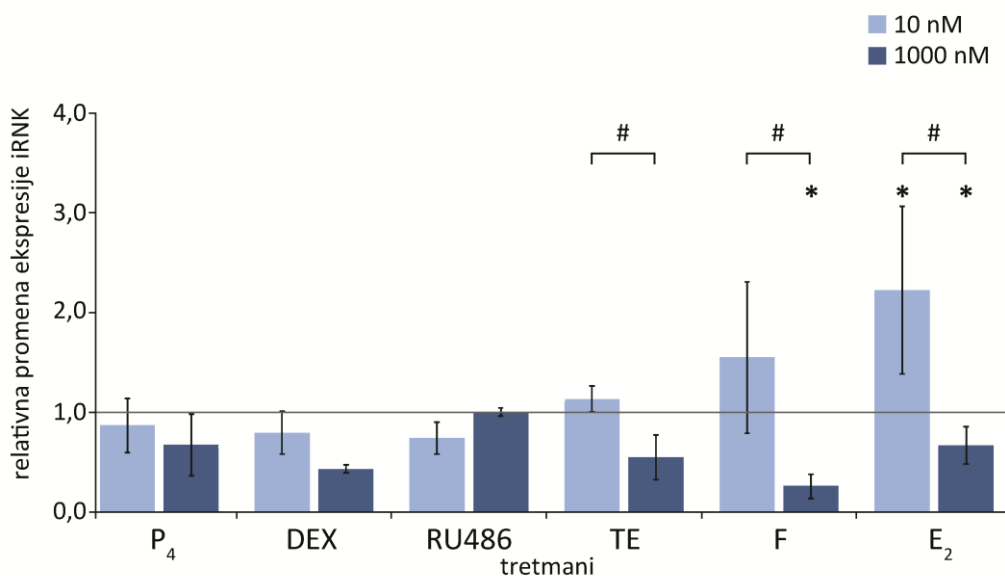
Regulacija galektina-1 u trofoblastnoj ćelijskoj liniji najpre je ispitana na nivou genske ekspresije (Slika 17). Nakon tretmana steroidnim hormonima i njihovim antagonistima može se uočiti da je gen za galektin-1 steroid specifično moduliran. Pri datim eksperimentalnim uslovima, koncentracija P₄ od 10 nM dovela je do blagog, ali značajnog smanjenja sinteze iRNK za galektin-1 ($p < 0,05$). Pri koncentraciji od 10 nM DEX nije uticao na ekspresiju *LGALS1* gena, dok je viša koncentracija DEX suprimirala ekspresiju ovog gena na ~ 40% vrednosti dobijene za kontrolu ($p < 0,05$). Obe koncentracije RU486 takođe su indukovale značajno smanjenje iRNA za galektin-1 ($p < 0,05$ za obe koncentracije). Niža koncentracija TE je značajno stimulisala sintezu iRNK za galektin-1. Pri koncentraciji od 1000 nM i TE i F su značajno inhibirali ekspresiju *LGALS1* ($p < 0,05$). Estradiol je, pri koncentraciji od 10 nM, ispoljio stimulatorni efekat na ekspresiju gena za galektin-1 u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). Nasuprot tome, veća koncentracija E₂ je imala suprotan efekat, i blago, ali značajno je smanjivala ekspresiju gena za galektin-1. Dobijeni rezultati su pokazali da efekti TE, F i E₂ na ekspresiju gena za galektin-1 zavise od primenjene doze, pri čemu niže koncentracije stimulišu, dok više koncentracije inhibiraju *LGALS1* ekspresiju.



Slika 17. Efekat P₄, DEX, RU486, TE, F i E₂ na nivo iRNK za galektin-1 u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji. Ćelije su gajene 48 sati u kompletnom RPMI 1640 medijumu bez (K) i sa odgovarajućim farmakološkim agensom (u koncentraciji 10 nM i 1000 nM). Normalizacija iRNK urađena je u odnosu na β-aktin kao endogenu kontrolu. Rezultati su predstavljeni kao relativna promena u odnosu na kontrolu ± SEM; n=3. * statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, p < 0,05; # statistički značajna razlika između tretmana, p < 0,05.

4.1.2.1.2. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na ekspresiju gena za galektin-3 (*LGALS3*) u HTR-8/SVneo ćelijama

HTR-8/SVneo ćelije inkubirane su tokom 48 h u kompletnom RPMI 1640 medijumu bez (K) ili sa P₄, DEX, RU486, TE, F i E₂ (10 nM i 1000 nM). Dobijeni rezultati su pokazali da je gen za galektin-3 steroid-specifično moduliran (Slika 18). Progesteron, DEX i RU486 nisu značajno uticali na nivo iRNK za galektin-3. Nasuprot tome, TE, F i E₂ su imali značajnog efekta na ekspresiju *LGALS3*. Dok su niže koncentracije TE i F blago stimulisale ekspresiju *LGALS3*, viša koncentracija je delovala inhibitorno ($p < 0,05$ za 1000 nM F). Pod uticajem E₂ ekspresija gena za galektin-3 se menjala slično kao i ekspresija *LGALS1*. Tako je niža koncentracija (10 nM E₂) značajno stimulisala ekspresiju *LGALS3*, dok je koncentracija E₂ od 1000 nM blago, ali statistički značajno dovela do smanjenja ekspresije ovog gena ($p < 0,05$).

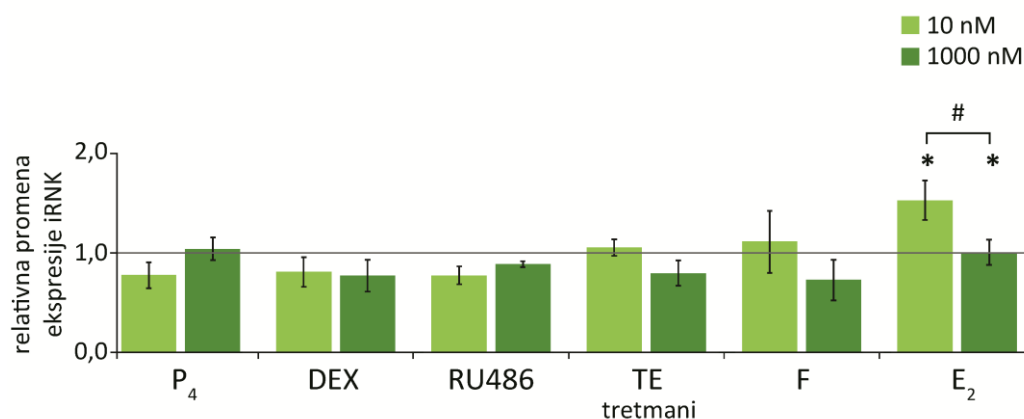


Slika 18. Efekat P₄, DEX, RU486, TE, F i E₂ na nivo iRNK za galektin-3 u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji. Ćelije su gajene 48 sati u kompletnom RPMI 1640 medijumu bez (K) i sa odgovarajućim farmakološkim agensom (u koncentraciji 10 nM i 1000 nM). Normalizacija iRNK urađena je u odnosu na β -aktin kao endogenu kontrolu. Rezultati su predstavljeni kao relativna promena u odnosu na kontrolu \pm SEM; $n=3$.

* statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, $p < 0,05$; # statistički značajna razlika između tretmana, $p < 0,05$.

4.1.2.1.3. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na ekspresiju gena za galektin-8 (*LGALS8*) u HTR-8/SVneo ćelijama

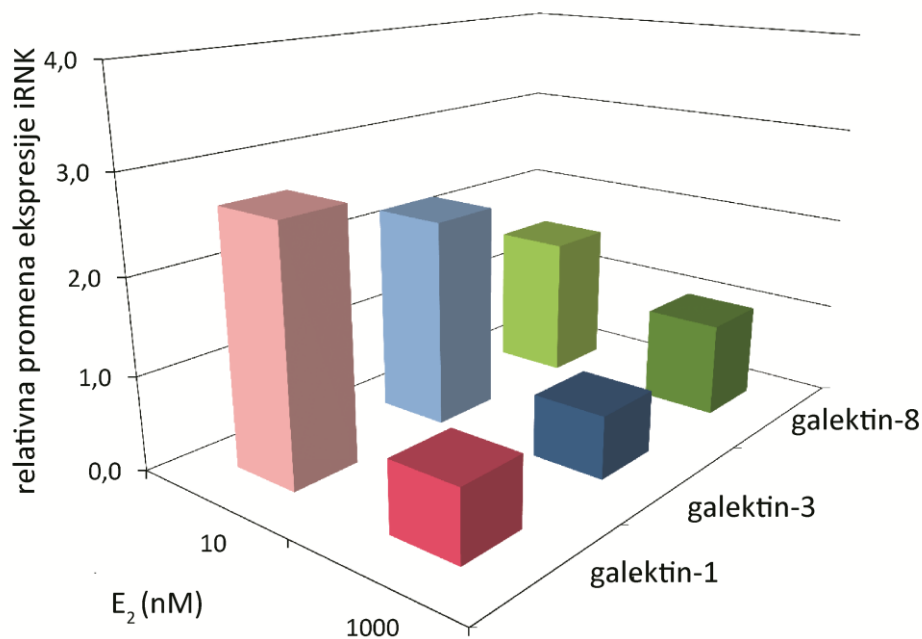
Ispitivan je uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na ekspresiju *LGALS8* gena u HTR-8/SVneo ćelijama (Slika 19). Dobijeni rezultati su pokazali da na ekspresiju gena za galektin-8 steroidni hormoni ispoljavaju najmanji efekat, u odnosu na gene za galektin-1 i -3. Promena ekspresije *LGALS8* je uočena samo pod uticajem E_2 . Ovaj hormon je na isti način modulirao ekspresiju *LGALS8*, kao i ekspresiju *LGALS1* i *LGALS3* gena - koncentracije od 10 nM i 1000 nM su delovale suprotno ($p < 0,05$), pri čemu je niža koncentracija stimulisala, a viša inhibirala ekspresiju gena za galektin-8, u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$).



Slika 19. *Efekat P_4 , DEX, RU486, TE, F i E_2 na nivo iRNK za galektin-8 u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji. Ćelije su gajene 48 sati u kompletnom RPMI 1640 medijumu bez (K) i sa odgovarajućim farmakološkim agansom (u koncentraciji 10 nM i 1000 nM). Normalizacija iRNK urađena je u odnosu na β -aktin kao endogenu kontrolu. Rezultati su predstavljeni kao relativna promena u odnosu na kontrolu \pm SEM; $n=3$. * statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, $p < 0,05$; # statistički značajna razlika između tretmana, $p < 0,05$.*

4.1.2.1.4. Uporedna analiza efekta E₂ na ekspresiju *LGALS1*, 3 i 8

Nakon tretmana HTR-8/SVneo ćelija steroidnim hormonima i antagonistima, uočeno je da su svi primenjeni hormoni i antagonisti u određenoj i relativno maloj meri ostvarili uticaj na ekspresiju *LGALS1* gena, dok je samo E₂ menjao nivo iRNK za sva tri ispitivana galektina. Tako je uticaj E₂ bio izraženiji na ekspresiju *LGALS1* i *LGALS3*, dok je ekspresija *LGALS8* bila manje podložna uticaju ovog hormona (Slika 20).



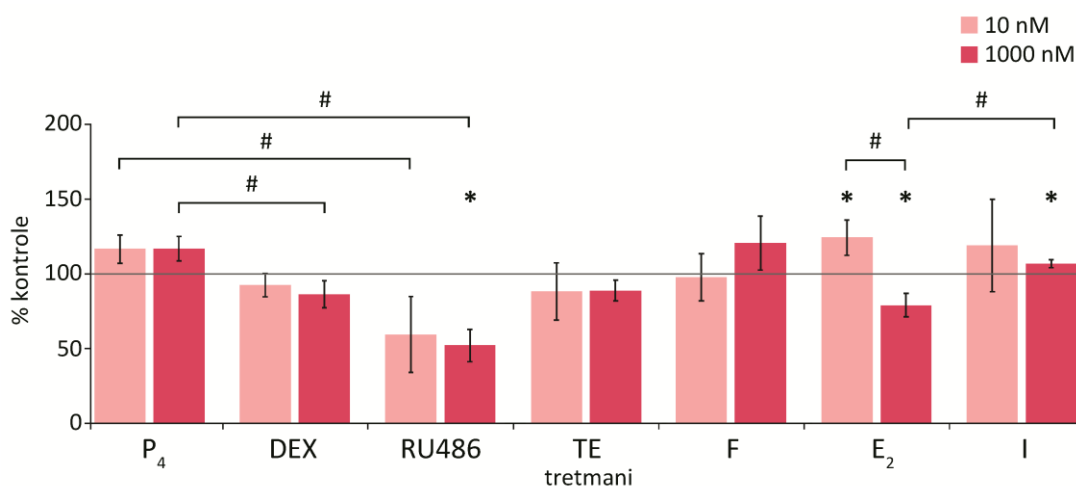
Slika 20. Relativni odnos promena ekspresije galektina-1, -3 i -8 u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji pod uticajem E₂.

4.1.2.2. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na nivo proteina galektina-1, -3 i -8 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo

4.1.2.2.1 Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na nivo proteina galektina-1 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo

Nakon tretmana steroidnim hormonima i njihovim antagonistima, može se uočiti da je galektin-1 steroid-specifično moduliran (Slika 21). Imunoblot analiza je pokazala

da obe koncentracije P₄ blago stimulišu galektin-1 u odnosu na kontrolu. Deksametazon i RU486, koji je parcijalni agonist-antagonist PR i GR, delovali su suprotno u odnosu na P₄. Tako, obe koncentracije DEX (10 i 1000 nM) blago smanjuju produkciju ovog lektina. Još veća inhibicija galektina-1, ~ 50% u odnosu na kontrolu, uočava se nakon tretmana 1000 nM RU486 ($p < 0,05$).

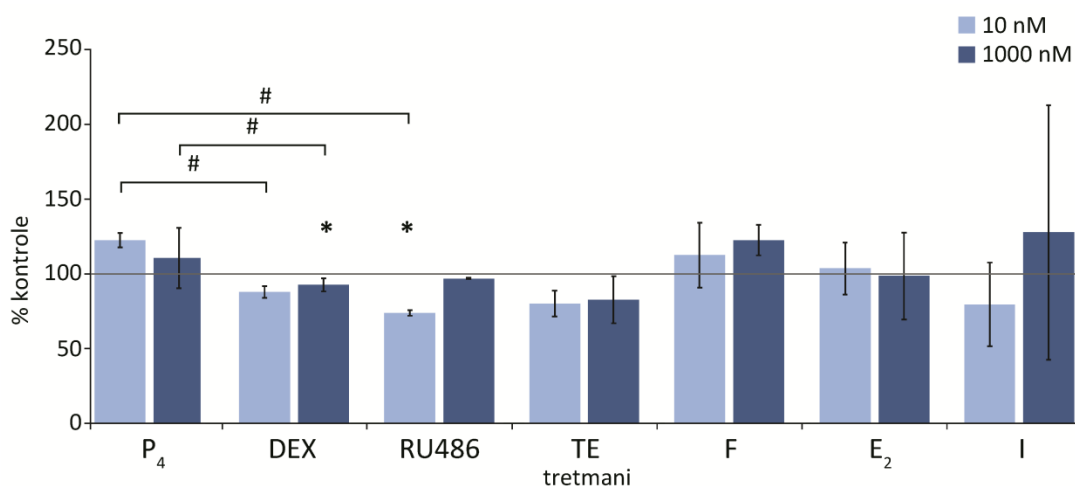


Slika 21. Efekat P₄, DEX, RU486, TE, F, E₂ i I na nivo proteina galektina-1 u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji (imunoblot analiza). Ćelije su gajene 48 sati u kompletnom RPMI 1640 medijumu bez (K) i sa odgovarajućim farmakološkim agensom (u koncentraciji 10 nM i 1000 nM). Normalizacija je vršena u odnosu na β-aktin. Dobijene vrednosti predstavljaju % ± SEM promene u odnosu na netretirane, kontrolne ćelije. * statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, $p < 0,05$; # statistički značajna razlika između tretmana, $p < 0,05$.

Pored toga, tretman 10 nM E₂ doveo je do značajnog povećanja nivoa galektina-1 u odnosu na kontrolu. Suprotno tome, koncentracija E₂ od 1000 nM je smanjila produkciju galektina-1, u odnosu na 10 nM E₂, ali i u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). Pored toga, estrogenski antagonist, fulvestrant (I), je blago stimulisao produkciju galektina-1 pri koncentraciji od 1000 nM, što je bilo suprotno u odnosu na istu koncentraciju E₂ ($p < 0,05$). Ispitivanja su pokazala da ni TE ni F ne utiču na nivo galektina-1 u HTR-8/SVneo ćelijama.

4.1.2.2.2 Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na nivo proteina galektina-3 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo

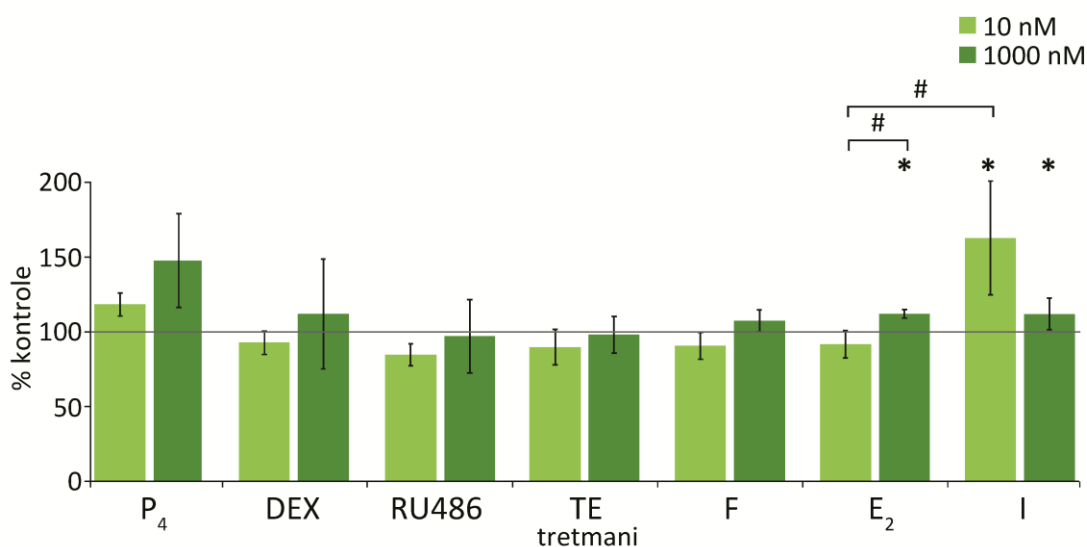
Nakon tretmana steroidnim hormonima i njihovim antagonistima, nivo galektina-3 u HTR-8/SVneo ćelijama je praćen primenom imunoblota (Slika 22). Nešto smanjen nivo galektina-3 u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$) postignut je nakon tretmana DEX (1000 nM) i mifepristonom (10 nM). Slično kao i kod galektina-1, P_4 je delovao stimulatorno, ali ne i značajno na nivo galektina-3 u odnosu na kontrolu. Međutim, stimulatorni efekat P_4 na nivo galektina-3 bio je značajan u odnosu na DEX (10 nM i 1000 nM; $p < 0,05$), kao i u odnosu na RU486 (10 nM; $p < 0,05$). Ostali hormoni i njihovi antagonisti nisu imali efekta na produkciju galektina-3.



Slika 22. Efekat P_4 , DEX, RU486, TE, F, E_2 i I na nivo proteina galektina-3 u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji (imunoblot analiza). Ćelije su gajene 48 sati u kompletnom RPMI 1640 medijumu bez (K) i sa odgovarajućim farmakološkim agansom (u koncentraciji 10 nM i 1000 nM). Normalizacija je vršena u odnosu na β -aktin. Dobijene vrednosti predstavljaju $\% \pm SEM$ promene u odnosu na netretirane, kontrolne ćelije. * statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, $p < 0,05$; # statistički značajna razlika između tretmana, $p < 0,05$.

4.1.2.2.3. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na nivo proteina galektina-8 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo

Nivo galektina-8 u HTR-8/SVneo ćelijama je takođe praćen nakon tretmana steroidnim hormonima i njihovim antagonistima korišćenjem imunoblota (Slika 23). Primljeni tretmani nisu značajnije promenili nivo galektina-8, dok je signifikantna razlika dobijena za E₂, ali na dozno zavisnosan način. Estradiol (1000 nM) je povećao nivo galektina-8 u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$), ali i u odnosu na nižu koncentraciju ovog hormona ($p < 0,05$). Estrogenski antagonist, fulvestrant je značajno stimulisao nivo galektina-8 u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$), pri obe ispitivane koncentracije. Pored toga, primećeno je da pri koncentraciji od 10 nM E₂ i I imaju suprotne efekte ($p < 0,05$).



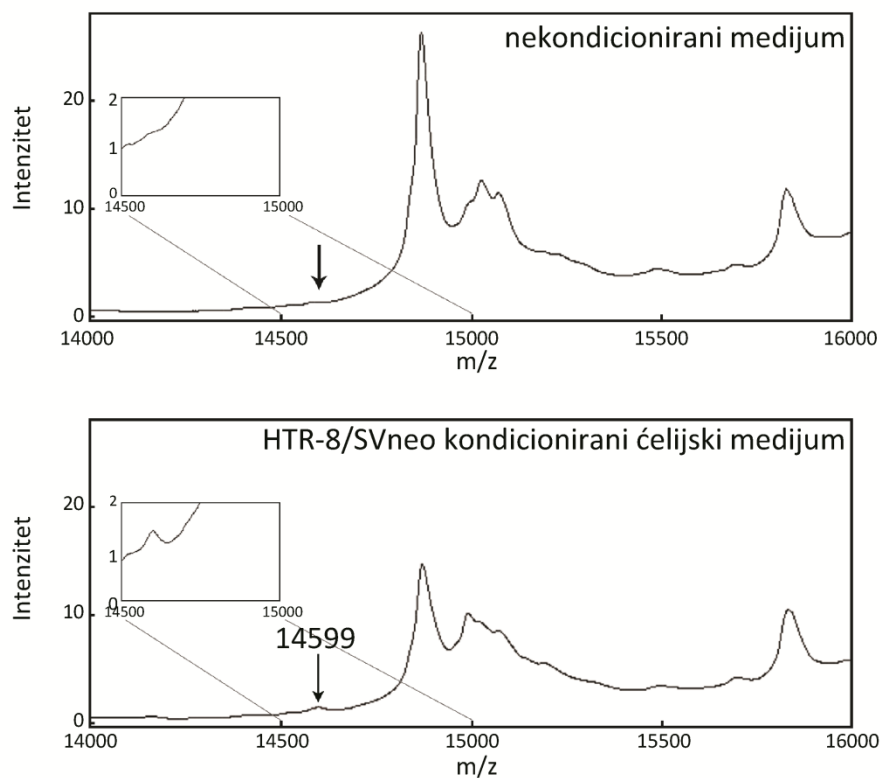
Slika 23. Efekat P₄, DEX, RU486, TE, F, E₂ i I na nivo proteina galektina-8 u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji (imunoblot analiza). Ćelije su gajene 48 sati u kompletnom RPMI 1640 medijumu bez (K) i sa odgovarajućim farmakološkim agansom (u koncentraciji 10 nM i 1000 nM). Normalizacija je vršena u odnosu na β-aktin. Dobijene vrednosti predstavljaju % ± SEM promene u odnosu na netretirane, kontrolne ćelije. * statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, $p < 0,05$; # statistički značajna razlika između tretmana, $p < 0,05$.

4.1.2.3. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na sekreciju galektina-1, -3 i -8 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo

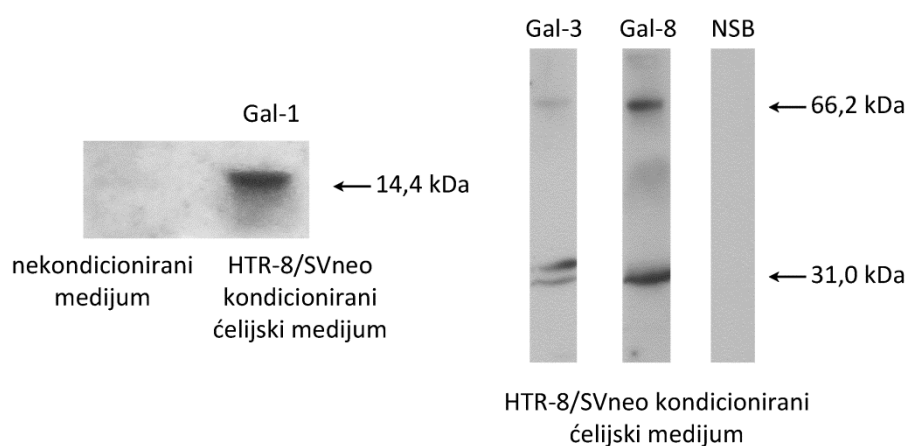
4.1.2.3.1. Sekretorni profil galektina HTR-8/SVneo ćelija

Ranije je pokazano da galektinski profil HTR-8/SVneo ćelija čine galektin-1, -3 i -8. Ovi podaci se odnose na ekspresiju gena za galektine (što je demonstrirano prisustvom odgovarajućih iRNK) i prisustvo proteina unutar ćelije. Međutim, sekrecija ovih galektina kao i njihov značaj u ekstravilusnom trofoblastu nisu u potpunosti ispitani.

Najpre je ispitano da li HTR-8/SVneo ćelije sekretuju neki od prisutnih galektina u medijum u kome su gajene – kondicionirani ćelijski medijum. Analiza kondicioniranih ćelijskih medijuma je izvršena primenom dve tehnike – SELDI-TOF MS i imunoblota (Slika 24). Proteini iz nekondicioniranog kompletnog RPMI 1640 medijuma i iz kondicioniranog HTR-8/SVneo ćelijskog medijuma imobilisani su na IMAC-30 proteinski čip. Analizom spektra utvrđeno je prisustvo molekuskog jona $m/z \sim 14600$ u kondicioniranom ćelijskom medijumu, ali ne i u nekondicioniranom medijumu. Primenom specifičnih anti-galektin-1 antitela (imunoblotom) detektovana je proteinska traka od 14,6 kDa takođe samo u kondicioniranom medijumu. Pored toga, ćelijski medijum je analiziran imunoblotom na prisustvo galektina-3 i -8 i pokazano je da HTR-8/SVneo ćelije, pored galektina-1, oslobađaju i galektin-3 (31 kDa, 33 kDa i 66 kDa) i galektin-8 (31 kDa i 66 kDa) (Slika 25). Ovim ispitivanjima je pokazano da HTR-8/SVneo ćelije oslobađaju van ćelije sva tri galektina, pri datim eksperimentalnim uslovima.



Slika 24. Prisustvo galektina-1 u medijumu HTR-8/SVneo ćelija. SELDI-TOF maseni spektar (IMAC30 čip) nekondicioniranog i kondicioniranog HTR-8/SVneo ćelijskog medijuma (48h). Spektar predstavlja zavisnost intenziteta proteinskog pika (y-osa) od odnosa mase i naelektrisanja, m/z (x-osa). Strelica pokazuje pik za koji je pretpostavljeno da odgovara galektinu-1 u kondicioniranom medijumu.

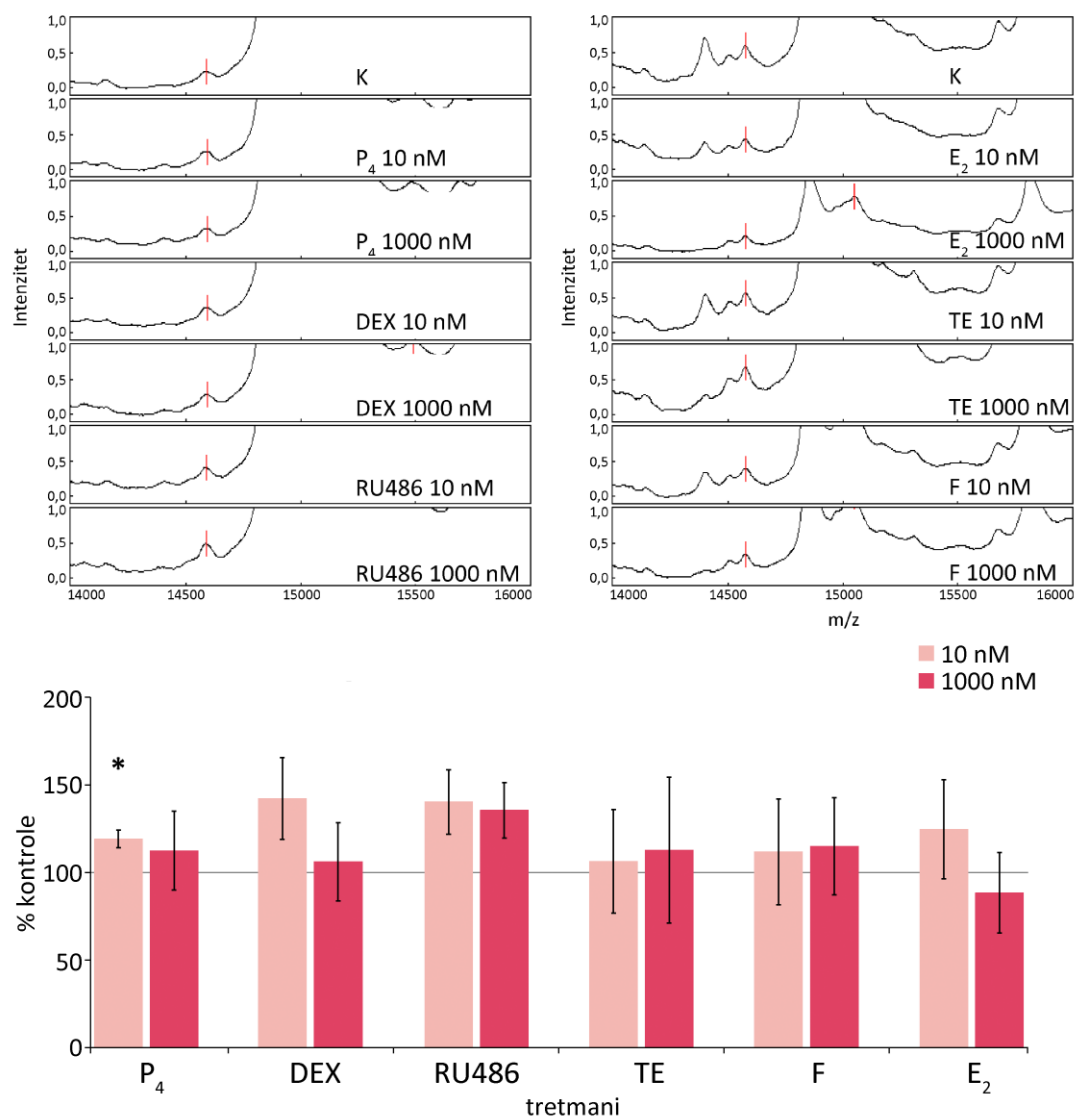


Slika 25. Galektinski sekretorni profil HTR-8/SVneo ćelija: galektin-1, -3 i -8. SDS-PAGE i imunoblot analiza kondicioniranih medijuma

4.1.2.3.2. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na sekreciju galektina-1 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo

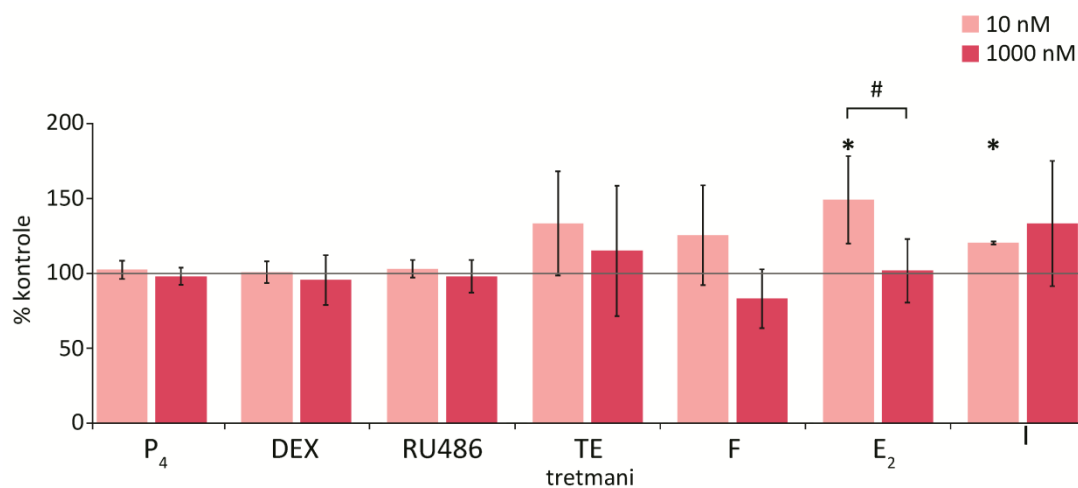
SELDI-TOF MS analiza i imunoblot omogućili su identifikaciju galektina-1 u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija. Sekrecija galektina se ne odvija klasičnim putem, već se ovi proteini oslobađaju van ćelije pretežno vezani za odgovarajući ligand. Ipak postoji mogućnost da određena količina galektina bude prisutna u medijumu i samostalno, pa je pretpostavljeno da bi ovaj galektin mogao biti detektovan SELDI-TOF MS kao vrlo osetljivom metodom. U HTR-8/SVneo ćelijskom medijumu, ali ne i nekondicioniranom medijumu detektovan je molekulski jon $m/z \sim 14600$. Poređenjem sa spektrima rekombinantnog, kao i galektina-1 izolovanog iz placente trećeg trimestra, pretpostavljeno je da bi ovaj molekulski jon mogao poticati od galektina-1 sekretovanog od strane HTR-8/SVneo ćelija. Ova pretpostavka potvrđena je imunoblotom.

Iako je u kondicioniranim ćelijskim medijumima detektovano nekoliko pikova u regionu 25-40 kDa, gde bi se očekivalo prisustvo galektina-3 i -8, primenom SELDI-TOF MS analize ipak nije moglo pouzdano da se utvrdi prisustvo ova dva galektina u kondicioniranim medijumima. Galektini-3 i -8 su bliskih molekularskih masa, 30 kDa i 32-38 kDa. Pored toga, u ovom regionu moglo bi se očekivati i prisustvo dimera galektina-1, čija je masa ~ 30 kDa.



Slika 26. SELDI-TOF analiza kondicioniranih medijuma HTR-8/SVneo ćelija nakon tretmana P₄, DEX, RU486, TE, F i E₂. A) Repräsentativni maseni spektri kondicioniranih medijuma HTR-8/SVneo ćelija. B) Semikvantitativna analiza intenziteta molekuskog jona m/z ~ 14600. Vrednosti za pojedinačne tretmane su predstavljene kao % u odnosu na kontrolu. Na dijagramu su predstavljene srednje vrednosti (%) ± SEM; n=3. * statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, p < 0,05.

Ćelijski medijum je analiziran SELDI-TOF MS (Slika 26A, B) i imunoblotom (Slika 27). Analizom spektara utvrđeno je prisustvo molekuskog jona $m/z \sim 14600$, za koji je pretpostavljeno da odgovara galektinu-1. Semikvantitativnom SELDI-TOF MS analizom je pokazano da je samo tretman od 10 nM P_4 stimulisao sekreciju galektina-1, $\sim 20\%$ u odnosu na kontrolu. Ostale supstance korišćene u ovom eksperimentu nisu imale uticaja na sekreciju galektina-1.



Slika 27. Efekat P_4 , DEX, RU486, TE, F, E_2 i I na sekreciju galektina-1 – imunoblot analiza kondicioniranih medijuma HTR-8/SVneo ćelija. Ćelije su gajene 48 sati u kompletnom RPMI 1640 medijumu bez (K) i sa odgovarajućim farmakološkim agensom (u koncentraciji 10 nM i 1000 nM). Vrednosti za pojedinačne tretmane su predstavljene kao % u odnosu na kontrolu. Na dijagramu su predstavljene srednje vrednosti (%) \pm SEM; $n=3$. * statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, $p < 0,05$; # statistički značajna razlika između tretmana, $p < 0,05$.

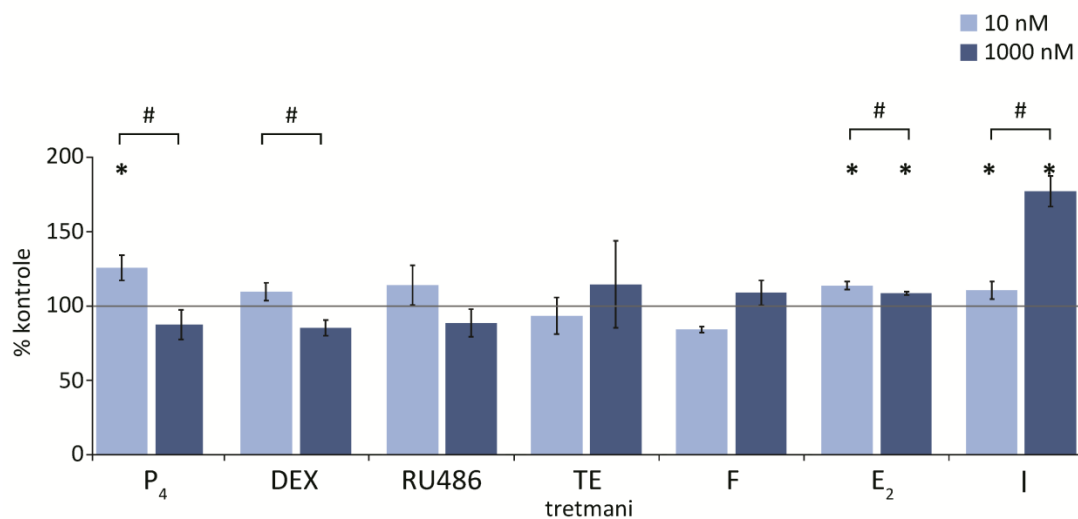
Imunoblotom je u svim ispitivanim medijumima detektovana traka od $\sim 14,6$ kDa. Semikvantitativnom denzitometrijskom analizom pokazano je da na sekreciju galektina-1 utiču samo E_2 i I, koji pri koncentraciji od 10 nM stimulišu sekreciju ovog lektina u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$).

Dve tehnike koje su upotrebljene za analizu sekretoma HTR-8/SVneo ćelija dale su nešto drugačije rezultate. Činjenica da se galektin-1 van ćelije može naći samostalno, ili vezan za odgovarajuće glikokonjugate, može uticati na razlike u rezultatima dobijenim primenom MS i imunoblota. SELDI-TOF MS omogućava detektovanje samo

„slobodnog“ galektina-1. S druge strane, redukujućom i denaturišućom SDS-PAGE u kombinaciji sa imunoblotom, određuje se ukupni vanćelijski galektin-1, odnosno „slobodni“ i galektin-1 koji je bio vezan za vanćelijske ligande.

4.1.2.3.3. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na sekreciju galektina-3 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo

Medijumi ćelija inkubiranih u prisustvu steroidnih hormona i njihovih antagonista analizirani su na prisustvo galektina-3 imunoblotom, upotrebom antitela specifičnih za ovaj lektin (Slika 28). Dobijeni rezultati su pokazali da niža koncentracija P₄ umereno, ali značajno stimuliše sekreciju galektina-3, ~ 25% u odnosu na kontrolu (p < 0,05). Blaga, ali ne i značajna stimulacija sekrecije ovog galektina se uočava i nakon inkubacije ćelija sa nižim koncentracijama DEX i RU486. Tretman višim koncentracijama P₄, DEX i RU486 blago inhibira sekreciju galektina-3. Nivo sekrecije galektina-3 se međutim ne menja kada su ćelije tretirane TE i F. Pod uticajem obe koncentracije E₂ sekrecija galektina-3 je stimulisana u odnosu na kontrolu (p < 0,05). Takođe sekrecija galektina-3 je bila stimulirana i nakon tretmana I (10 nM i 1000 nM; p < 0,05), pri čemu je efekat I u koncentraciji od 1000 nM bio najizraženiji.

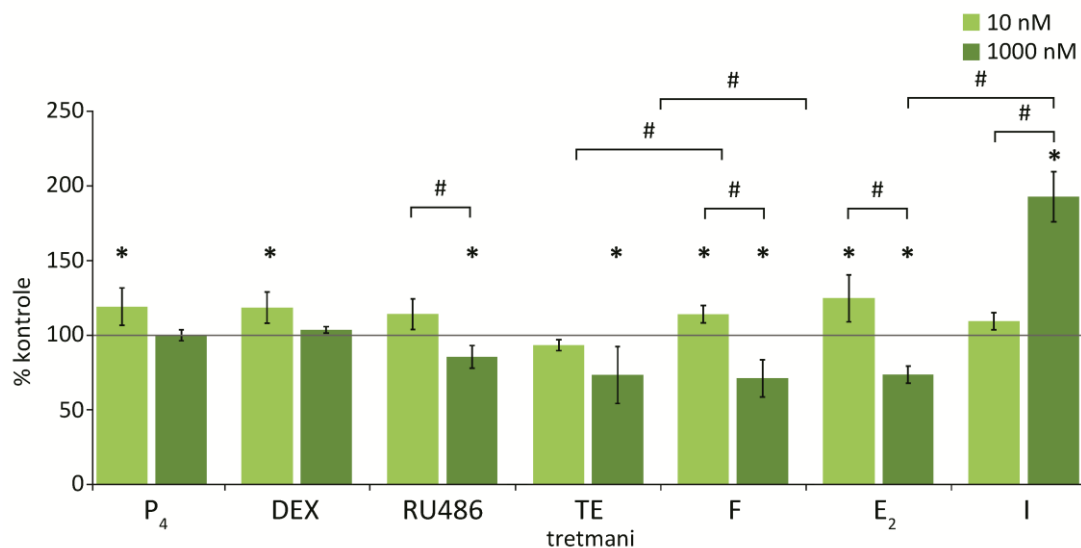


Slika 28. Efekat P₄, DEX, RU486, TE, F, E₂ i I na sekreciju galektina-3 - imunoblot analiza kondicioniranih medijuma HTR-8/SVneo ćelija. Ćelije su gajene 48 sati u kompletnom RPMI 1640 medijumu bez (K) i sa odgovarajućim farmakološkim agensom (u koncentraciji 10 nM i 1000 nM). Vrednosti za pojedinačne tretmane su predstavljene kao % u odnosu na kontrolu. Na dijagramu su predstavljene srednje vrednosti (%) ± SEM; n=3. * statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, p < 0,05; # statistički značajna razlika između tretmana, p < 0,05.

4.1.2.3.4. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na sekreciju galektina-8 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo

Prisustvo galektina-8 u medijumu ćelija tretiranih steroidnim hormonima i njihovim antagonistima analizirano je imunoblotom, primenom antitela specifičnih za ovaj galektin (Slika 29). Ispitivanja su pokazala da P₄ i DEX pri koncentraciji od 10 nM stimulišu sekreciju galektina-8 u odnosu na kontrolu (p < 0,05). Mifepriston u koncentraciji od 1000 nM deluje inhibitory na oslobađanje ovog lektina u odnosu na kontrolu (p < 0,05), kao i na tretman nižom koncentracijom RU486 (p < 0,05). Sekrecija galektina-8 je smanjena u odnosu na kontrolu pod uticajem TE i F (1000 nM; p < 0,05). U zavisnosti od primenjene koncentracije, F ispoljava suprotno delovanje u odnosu na kontrolu – pri koncentraciji od 10 nM stimuliše (p < 0,05), a pri koncentraciji od 1000 nM inhibira (p < 0,05) sekreciju galektina-8. Pokazano je i da E₂ takođe utiče na

sekreciju galektina-8. Estradiol (10 nM) deluje stimulatorno na sekreciju galektina-8, kako u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$), tako i u odnosu na višu koncentraciju E_2 koja inhibira sekreciju galektina-8 u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). Suprotno tome, viša koncentracija I značajno stimuliše oslobađanje ovog lektina i to u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$), na nižu koncentraciju I ($p < 0,05$), odnosno istu koncentraciju E_2 .



Slika 29. Efekat P_4 , DEX, RU486, TE, F, E_2 i I na sekreciju galektina-8 - imunoblot analiza kondicioniranih medijuma HTR-8/SVneo ćelija. Ćelije su gajene 48 sati u potpunom RPMI 1640 medijumu bez (K) i sa odgovarajućim farmakološkim agensom (u koncentraciji 10 nM i 1000 nM). Vrednosti za pojedinačne tretmane su predstavljene kao % u odnosu na kontrolu. Na dijagramu su predstavljene srednje vrednosti (%) \pm SEM; $n=3$.

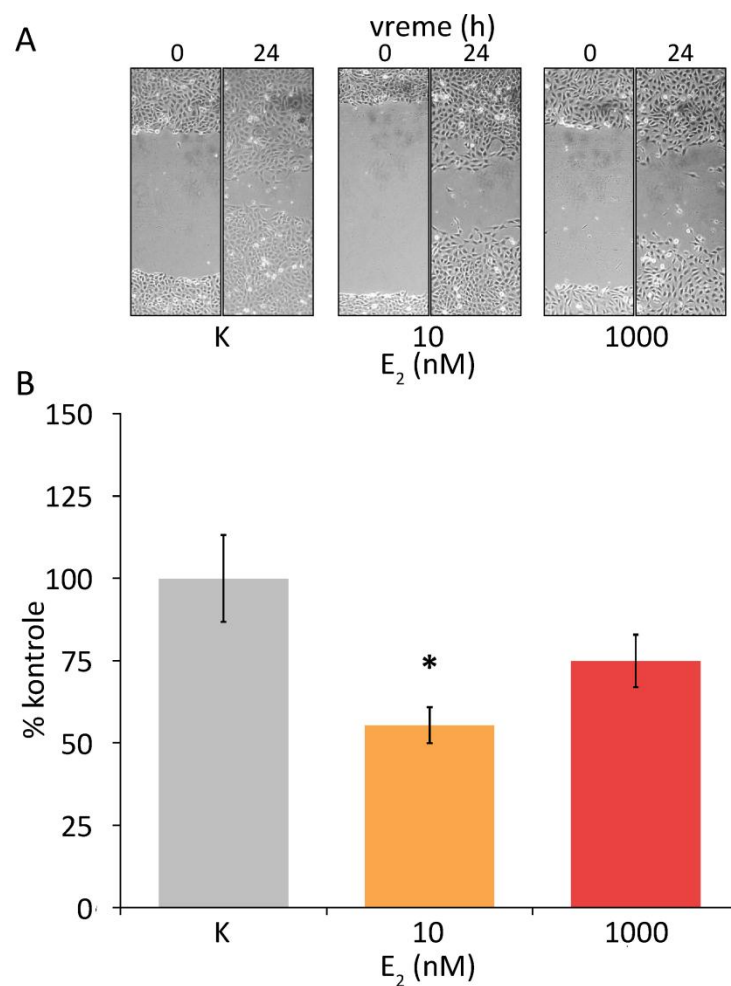
4.1.3. Uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na funkcionalna svojstva trofoblasta

4.1.3.1. Test ćelijske migracije

Pored ispitivanja uticaja steroidnih hormona na regulaciju galektina u EVT, postavljeno je pitanje da li neki od steroidnih hormona utiče i na sama funkcionalna svojstva trofoblasta. Na osnovu literaturnih podataka i rezultata dobijenih u okviru ove studije, ispitan je uticaj E_2 na migraciju HTR-8/SVneo ćelija. Kako je pokazano da E_2 utiče na ekspresiju galektina-1 u trofoblastu i da efekat zavisi od primenjene

koncentracije, pretpostavljeno je da bi ovaj hormon mogao modulirati i migratorna svojstva HTR-8/SVneo ćelija.

Konfluentan monolejer ćelija ravnomerno je narušen i ćelije su inkubirane bez prisustva E_2 (K) ili u prisustvu E_2 (10 i 1000 nM) tokom narednih 24 h (Slika 28). Dobijeni rezultati su pokazali da E_2 deluje inhibitorno na migraciju EVT. Efekat je bio izraženiji za nižu koncentraciju E_2 (55,4% u odnosu na kontrolu, $p < 0,05$), dok pri 1000 nM E_2 inhibicija nije bila statistički značajna (74,9% u odnosu na kontrolu).

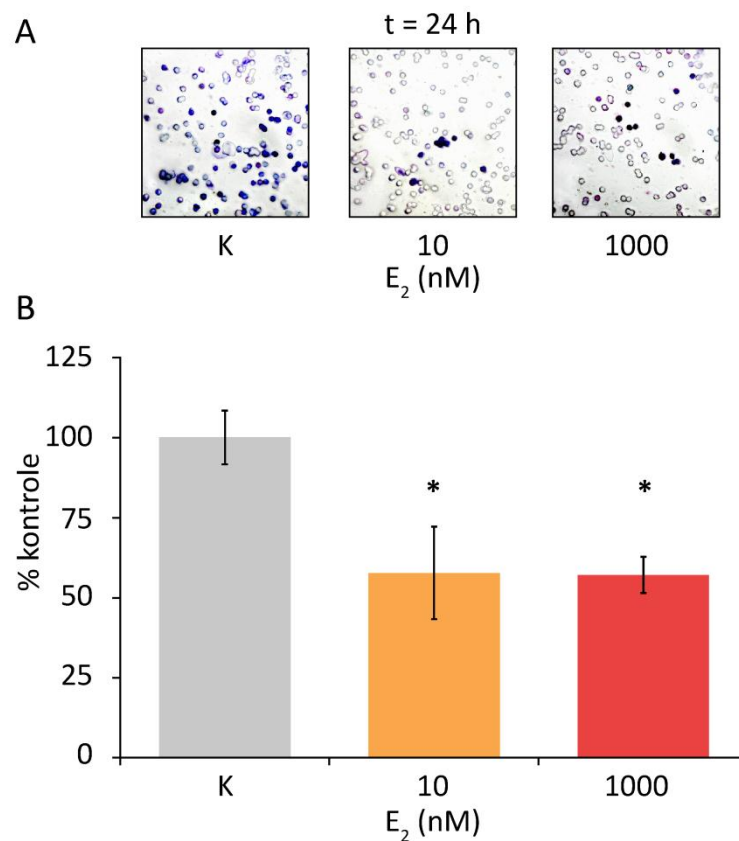


Slika 30. Efekat E_2 (10 i 1000 nM) na migraciju HTR-8/SVneo ćelija.

A) Reprezentativni eksperiment migracije $t = 0$ i $t = 24$ h bez tretmana (K) i u prisustvu dve koncentracije E_2 (10 i 1000 nM). B) Grafički prikaz odnosa površina „zaraščivanja” ozlede ćelijskog sloja nakon 24h. Dobijene vrednosti su izražene u odnosu na kontrolu (100%) i prikazane kao $\% \pm SEM$. * statistički značajna razlika u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$)

4.1.3.2. Test ćelijske invazije

Pored migracije, u ovom radu je praćen i efekat E_2 na invazivna svojstva HTR-8/SVneo ćelija u testu *transwell* invazije (Slika 31). Ćelije su inkubirane tokom 24 h bez (K) ili u prisustvu 10 nM i 1000 nM E_2 . Estradiol je u obe ispitivane koncentracije značajno inhibirao invaziju HTR-8/SVneo ćelija, ~ 45% u odnosu na kontrolu.

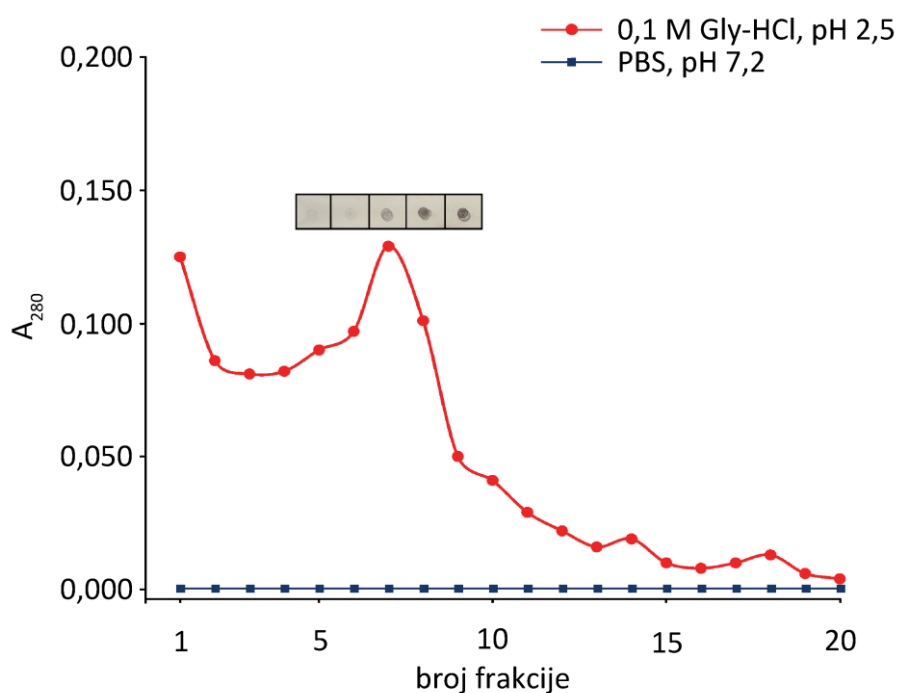


Slika 31. Efekat E_2 na invaziju HTR-8/SVneo ćelija. Ćelije su tretirane E_2 (10 nM i 1000 nM) tokom 24h. A) Reprezentativne slike obojenih membrana sa zauzetim porama predstavljene su kvadratima iznad odgovarajućih stubića. B) Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost broja zauzetih pora \pm SEM i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu; $n \geq 2$. Statistički značajne razlike označene su *, $p < 0,05$.

4.2. Galektin-1 iz placente trećeg trimestra: izolovanje i karakterizacija

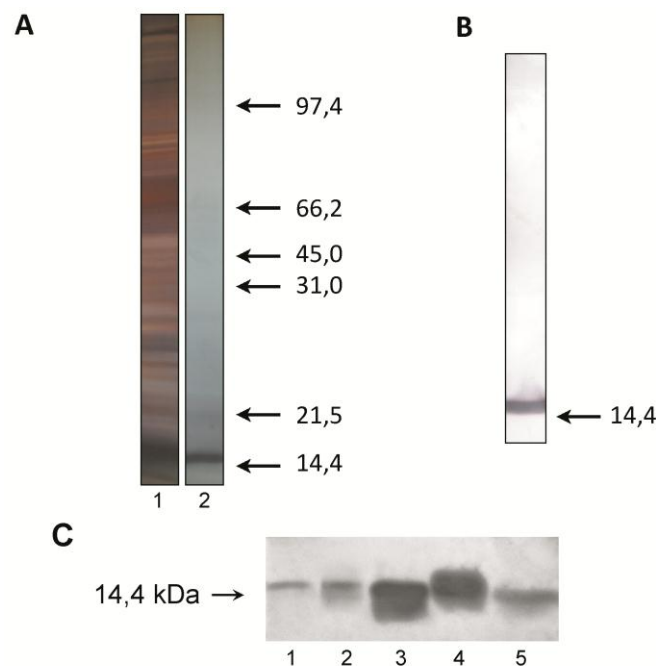
4.2.1. Biohemijska karakterizacija placentnog galektina-1

Kao polazni materijal za izolovanje galektina-1 korišćena je placenta nakon porođaja. Galektin-1 je iz tkiva placente izdvojen laktoznom ekstrakcijom, u redukujućim uslovima, i prečišćen primenom afinitetne hromatografije na Lac-Sepharose 4B koloni (Slika 32). U odsustvu redukujućeg agensa, galektin-1 iz placentnog ekstrakta se nije vezao za Lac-Sepharose 4B kolonu (Slika 32., PBS).



Slika 32. Izolovanje galektina-1 iz placente trećeg trimestra lektinskom afinitetnom hromatografijom na Lac-Sepharose 4B koloni. Nevezani proteini eluirani su EDTA-MEPBS puferom (nije prikazano). Galektin-1 je eluiran sa kolone 0,1 M Gly-HCl puferom, pH 2,5. Sakupljane su frakcije od po 3 mL, a elucija je praćena merenjem apsorbance na 280 nm. Početna visoka apsorbancia posledica je promene pufera koji je propušten kroz kolonu. Frakcije (5-9) u kojima je prisustvo galektina-1 potvrđeno dot-blot testom su spojene i koncentrovane. U odsustvu 2-ME, galektin-1 se ne vezuje za Lac-Sepharose 4B kolonu (PBS).

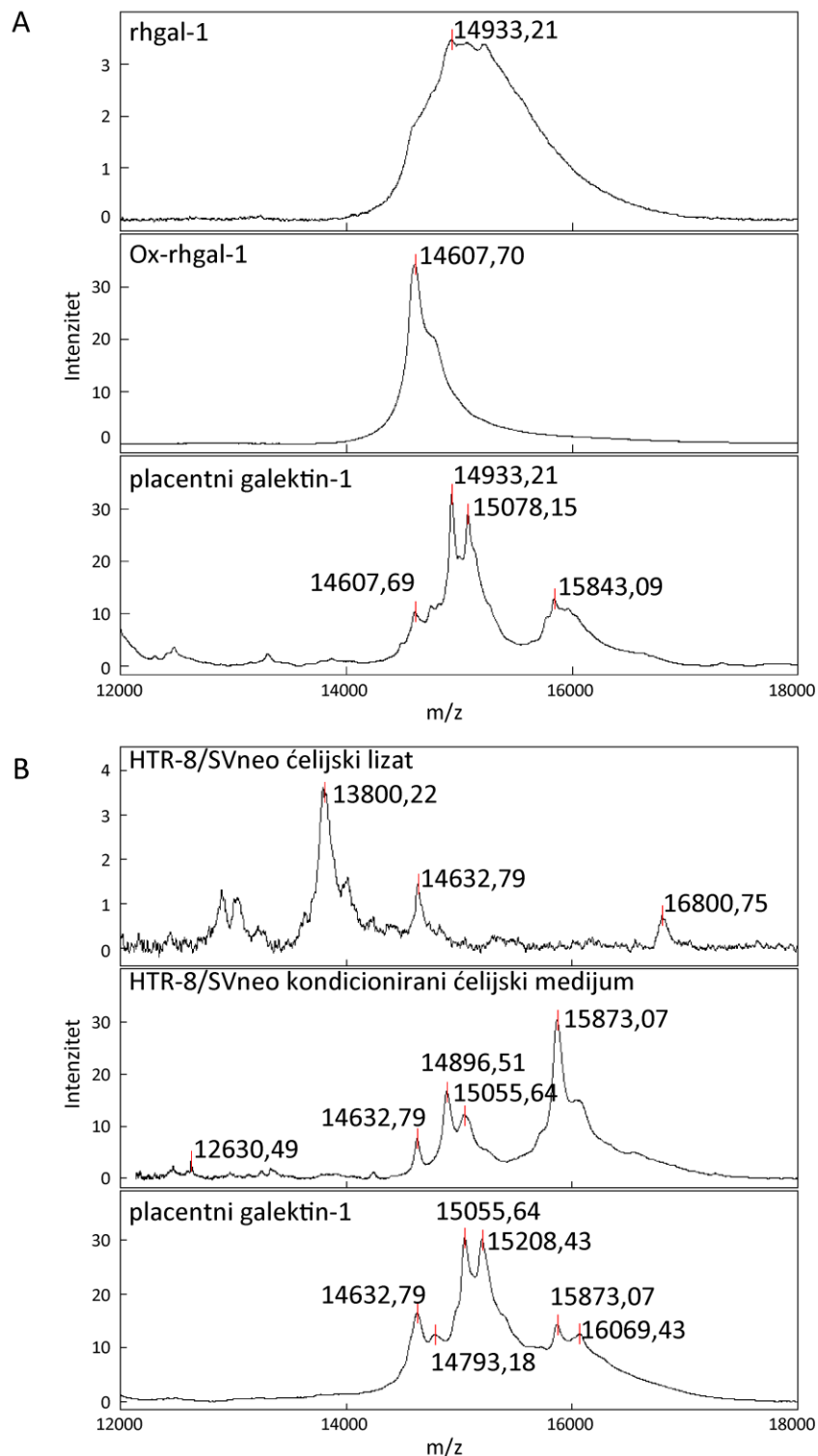
Nakon izolovanja i prečišćavanja, placentni galektin-1 je identifikovan i potvrđen primenom SDS-PAGE i Western blota, odnosno SELDI-TOF MS. Proteini placentnog ekstrakta, kao i proteini sakupljenih frakcija sa Lac-Sepharose 4B kolone, razdvojeni su SDS-PAGE na gradijentu gela 5-20% i obojeni srebro nitratom (Slika 33A). SDS-PAGE galektin-1 izolata iz ekstrakta placentne trećeg trimestra, ukazala je na prisustvo trake od ~ 14 kDa za koju je pretpostavljeno da odgovara galektinu-1. Izolovani protein je dalje analiziran imunoblotom korišćenjem poliklonskih antitela prema galektinu-1 i detektovana je traka od ~14 kDa. (Slika 33B). Poređenjem izolovanog galektina-1 sa ovim lektinom iz HTR-8/SVneo ćelija, sekretovanim galektinom-1, kao i dva različita rekombinantna galektina-1 nakon imunoblota, u svim ispitivanim uzorcima uočene su trake mase od 14-15 kDa (Slika 33C).



Slika 33. Identifikacija galektina-1 izolovanog iz placentne trećeg trimestra. A) SDS-PAGE placentnog ekstrakta i pulovanih frakcija sa Lac-Sepharose 4B kolone. Placentni ekstrakt (1), izolovani galektin-1 (2). B) Imunodetekcija izolovanog galektina-1 i poređenje sa galektinom-1 iz drugih izvora pomoću poliklonskih anti-galektin-1 antitela. HTR-8/SVneo ćelijski lizat (1) i kondicionirani medijum (2), Ox-rhgal-1 (3), rhgal-1(4), izolovani placentni galektin-1 (5).

SELDI-TOF MS metoda upotrebljena je za uporednu analizu izolovanog galektina-1 sa dva različita komercijalno dostupna rekombinantna galektina-1 (rhgal-1, Acris Antibodies GmbH, Herford, Nemačka i Ox-rhgal-1, Kirin, Japan), kao i sa galektinom-1 prisutnim u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji. Placentni galektin-1 i rekombinantni preparati galektina-1 naneti su na NP20 protein-čip. Maseni spektar placentnog galektina-1 upoređen je sa masenim spektrima rhgal-1 i Ox-rhgal-1, koji su uzeti kao referentni spektri (Slika 34A). U spektru placentnog galektina-1 detektovani su molekularski joni sledećih m/z: 14607,69; 14933,21; 15078,15 i 15843,09. U spektru Ox-rhgal-1 detektovan je molekularski jon na m/z 14607,70, dok je u spektru rhgal-1 dobijeno nekoliko molekularskih jona vrlo bliskih vrednosti m/z pri ~ 14900, od kojih je prvi pik imao m/z vrednost 14933,21. Primenom SELDI TOF MS, na osnovu prisustva molekularskih jona prisutnih sa m/z 14607,69 i 14933,21 pokazana je identičnost izolovanog galektina-1 u odnosu na rekombinantne galektine-1.

Pored toga, izolovani galektin-1 upoređen je i sa spektrima HTR-8/SVneo ćelijskog lizata i kondicioniranog ćelijskog medijuma (Slika 34B). Analiza galektina-1 u uzorcima placentnog galektina-1, ćelijskog lizata i kondicioniranog medijuma izvršena je primenom PS20 protein čipa, za koji su najpre imobilisana specifična anti-galektin-1 antitela, a zatim su naneti uzorci. U masenim spektrima placentnog galektina-1, HTR-8/SVneo ćelijskog lizata i HTR-8/SVneo kondicioniranog ćelijskog medijuma, utvrđeno je prisustvo molekularskog jona m/z 14632,79, što ukazuje na prisustvo oksidovane forme galektina-1.



Slika 34. SELDI-TOF MS analiza izolovanog placentnog galektina-1. A) SELDI-TOF maseni spektri (NP20 čip) rekombinantnih preparata rhgal-1 i Ox-rhgal-1 i placentnog galektina-1. B) SELDI-TOF maseni spektri (PS20 čip) placentnog galektina-1, HTR-8/SVneo ćelijskog lizata i ćelijskog medijuma.

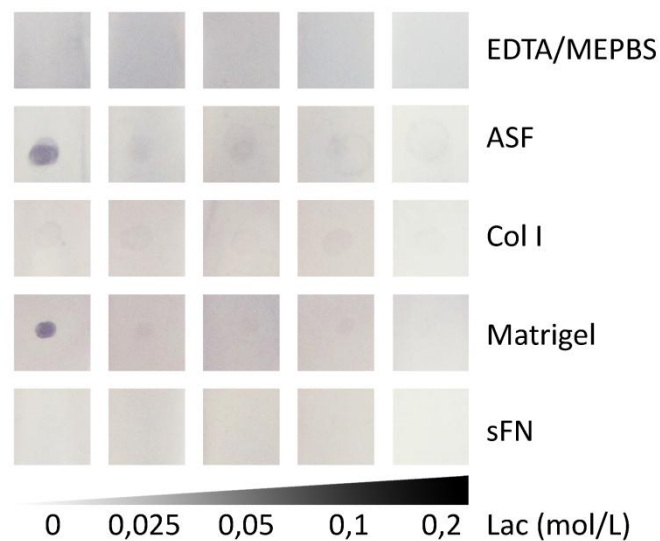
Rezultati dobijeni primenom imunoblota i masene spektrometrije ukazuju da je izolovani placentni galektin-1 zadržao strukturne i antigene karakteristike.

4.2.2. Ispitivanje lektinske aktivnosti placentnog galektina-1

Pored biohemijske karakterizacije ispitano je da li je izolovani galektin-1 zadržao svoja lektinska svojstva. Galektini ispoljavaju svoja lektinska svojstva u redukujućim uslovima, zbog čega je tokom izolovanja, kao i u svim testovima za ispitivanje lektinske aktivnosti korišćen EDTA-MEPBS pufer. Lektinska aktivnost placentnog galektina-1 delimično je pokazana već i tokom postupka prečišćavanja na laktoznoj koloni. Ukoliko je placentni ekstrakt pripremljen samo u PBS, galektin-1 iz placentne nije ispoljio svoju lektinsku aktivnost, te se, u odsustvu redukujućeg agensa, nije ni vezao za laktozu imobilisanu za Sepharose 4B kolonu (Slika 32).

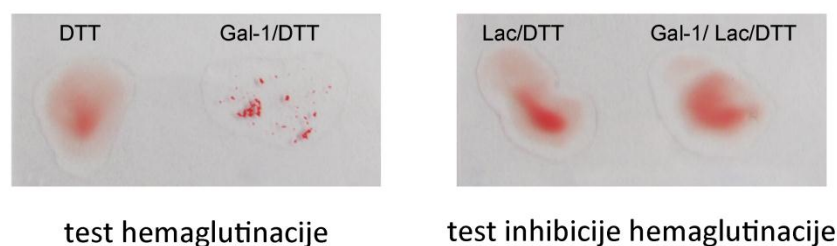
Lektinska aktivnost izolovanog i prečišćenog placentnog galektina-1 dalje je potvrđena lektinskim testom vezivanja na čvrstoj fazi (Slika 35) i testom hemaglutinacije (Slika 36). Kao redukujući agensi korišćeni su 2-ME ili DTT. Za ispitivanje lektinske aktivnosti izolovanog galektina-1, testovi su izvođeni u prisustvu Lac, inhibitornog šećera lektinske aktivnosti galektina.

Da bi se ispitala lektinska aktivnost izolovanog galektina-1, formiran je lektinski test na čvrstoj fazi. Ovim testom je ispitivano vezivanje izolovanog placentnog galektina-1 za: ASF koji je jedan od prvih opisanih liganada galektina-1, glikoprotein vanćelijskog matriksa - kolagen tipa I (Col I), smešu različitih glikoproteina bazalne membrane – Matrigel® i serumski fibronektin (sFN) koji po podacima iz literature nije ligand galektina-1. Rezultati prikazani na Slici 35. pokazuju da se izolovani galektin-1 vezuje sa ASF i Matrigel®, kao i da je vezivanje za ponuđene ligande smanjeno u prisustvu Lac. Ova inhibicija je dozno zavisna, u odnosu na koncentraciju Lac – što je koncentracija Lac veća, vezivanje je slabije. Pored toga, može se uočiti da placentni galektin-1 ne vezuje Col I, kao ni sFN.



Slika 35. Lektinski test na čvrstoj fazi. Na nitroceluloznu membranu naneti su različiti glikokonjugati: ASF i Matrigel® (ligandi galektina-1), sFN i Col I (negativna kontrola) i EDTA-MEPBS (nespecifično vezivanje).

Lektinska aktivnost i specifičnost izolovanog placentnog galektina-1 dalje je ispitivana testovima hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije (Slika 36). Kako se može uočiti izolovani galektin-1 u prisustvu DTT dovodi do hemaglutinacije eritrocita kunića. Uporedo je rađen i test hemaglutinacije u prisustvu laktoze, što je dovelo do inhibicije hemaglutinacije. Rezultati dobijeni lektinskim testom na čvrstoj fazi, kao i testom hemaglutinacije, ukazuju da je izolovani placentni galektin-1 zadržao i svoje lektinske karakteristike.



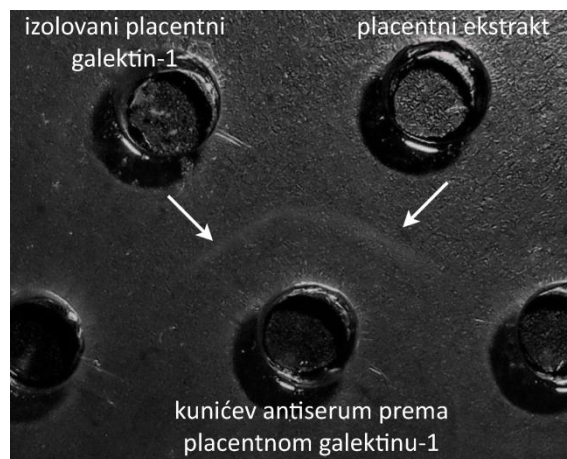
Slika 36. Test hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije. Izolovani galektin-1 u redukujućim uslovima dovodi do aglutinacije eritrocita kunića, dok prisustvo Lac inhibira aglutinaciju. Puffer (PBS/DTT) služi kao negativna kontrola.

4.3. Prečišćavanje i karakterizacija poliklonskih antitela prema galektinu-1

Izolovani i okarakterisani placentni galektin-1 poslužio je za imunizaciju kunića i dobijanje poliklonskih anti-galektin-1 antitela.

4.3.1. Reaktivnost dobijenog kunićevog antiseruma

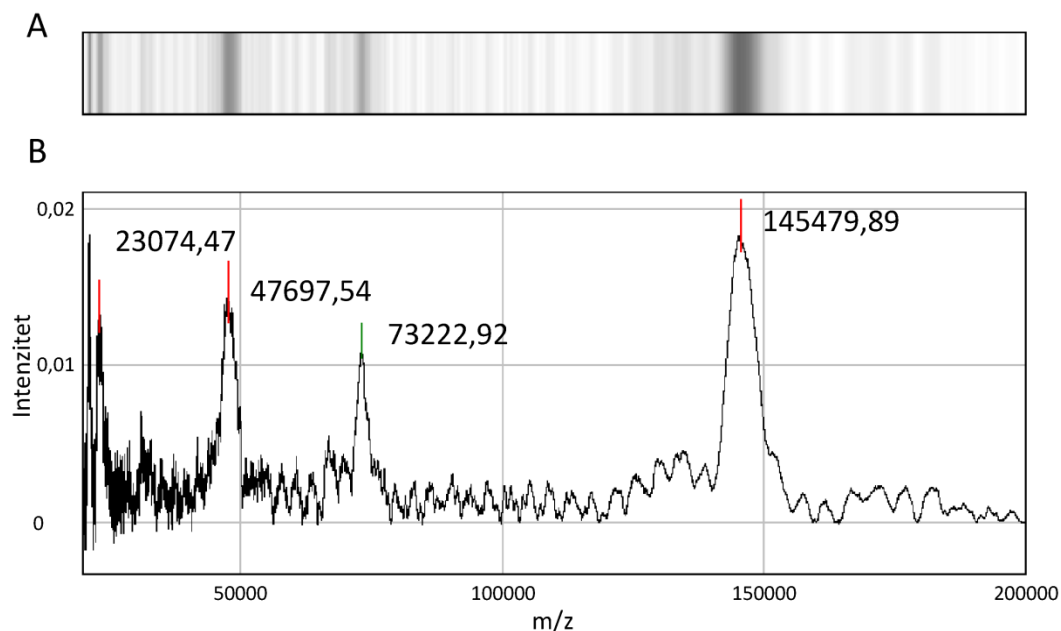
Specifičnost dobijenog kunićevog antiseruma prema galektinu-1 testirana je primenom dvostruke imunodifuzije u agaroznom gelu (Slika 37). Precipitacione trake uočene su između otvora sa kunićevim antiserumom i otvora sa izolovanim galektinom-1, kao i između otvora sa antiserumom i otvora sa neprečišćenim placentnim ekstraktom. Spajanje precipitacionih linija i formiranje luka ukazuje na postojanje istog antigena. Prisustvo dodatnih precipitacionih linija između otvora sa antiserumom i otvora sa placentnim ekstraktom nije uočeno.



Slika 37. Dvostruka imunodifuzija u 2% agaroznom gelu. Strelicama su označene precipitacione linije koje predstavljaju kompleks antigen/antitelo.

4.3.2. Karakterizacija poliklonskih antitela prema galektinu-1

Kako je dvostrukom imunodifuzijom pokazana reaktivnost kunićevog antiseruma prema galektinu-1, iz dobijenog antiseruma je izdvojena IgG frakcija kaprilnom kiselinom. Dobijena poliklonska antitela prema humanom placentnom galektinu-1 analizirana su pomoću SELDI-TOF MS, na NP20 protein čipu. U dobijenom masenom spektru imunoglobulinske frakcije izdvojene iz seruma kunića identifikovano je nekoliko molekulskih jona: m/z 145479,89 koji odgovara intaktnom molekulu IgG, m/z 47697,54 što odgovara teškom, i m/z 23074,47 lakom lancu IgG. Dobijeni rezultati ukazuju da je izdvojena IgG frakcija homogena (Slika 38).



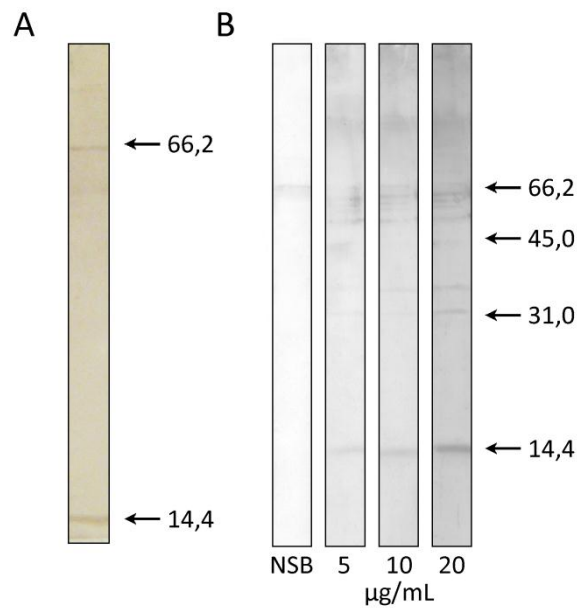
Slika 38. SELDI-TOF maseni spektar (NP20 čip) IgG frakcije izdvojene iz seruma kunića imunizovanog galektinom-1. Detektovani su intaktni IgG molekul (m/z 145479,89 i m/z 73222,92 koji predstavlja dvostruko protonovane molekule), teški lanac (m/z 47697,54) i laki lanac (m/z 23074,47). Dobijeni rezultati su dati u formi gel-prikaza (A) i spektra (B). Spektar predstavlja zavisnost intenziteta proteinskog pika (y-osa) od odnosa mase i naelektrisanja (m/z) proteina (x-osa).

Imunoelektroforeza je dvostepeni postupak, koji obuhvata elektroforezu i imunoprecipitaciju. Frakcija IgG izdvojena iz kunićevog seruma kaprilnom kiselinom, podvrgnuta je elektroforezi u 1% gelu agara, u veronalnom puferu pH 8,6. Pri datim eksperimentalnim uslovima, Ig su nenaelektrisani (pH 8,6), ali zbog izraženog efekta endosmoze (agar gel) ispoljavaju katodnu pokretljivost. Nakon elektroforeze, u kanal paralelan sa pravcem kretanja proteina, nanet je ovčiji anti-kunić IgG. Nakon inkubacije od 24 h na +4 °C, proteini su difundovali kroz gel, i na mestu ekvivalentnog odnosa antigena (kunićev IgG) i antitela (ovčiji anti-kunić IgG), formiran je antigen/antitelo kompleks. Ovaj kompleks, vizuelno se detektuje u vidu precipitacionog luka (Slika 39).



Slika 39. Imunoelektroforeza kunićevih antitela prema galektinu-1. Strelicom je označena precipitaciona linija koju formira kompleks kunićev IgG/anti-kunić IgG.

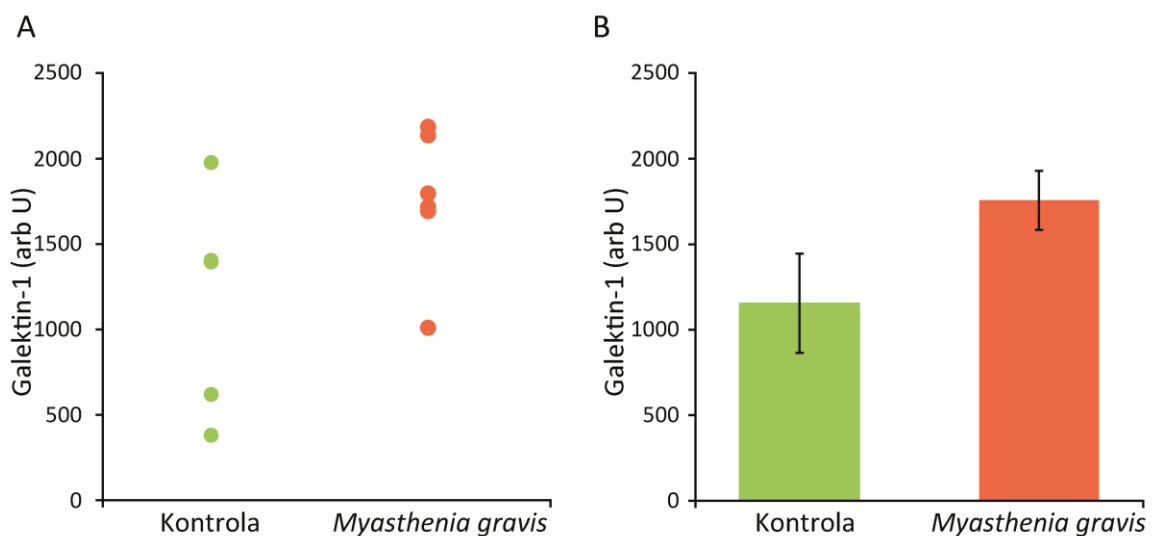
Imunoreaktivnost prečišćenih antitela prema galektinu-1 potvrđena je imunoblotom. Izdvojena antitela pokazala su imunoreaktivnost prema imunogenu - izolovanom placentnom galektinu-1. Detektovana je jedna traka od ~ 14 kDa (Slika 7A). Takođe, ispitana je i reaktivnost dobijenih antitela prema ćelijskom lizatu HTR-8/SVneo i pokazano je da antitela prepoznaju galektin-1 mase ~ 14 kDa u ćelijama EVT (Slika 40).



Slika 40. A) Imunoreaktivnost izdvojene IgG frakcije. Prečišćeni galektin-1 iz placente trećeg trimestra, nakon SDS-PAGE, detektovan je imunoblotom korišćenjem izdvojenog kunićevog IgG (u koncentraciji 10 µg/mL) kao primarnog antitela. B) Titriranje kunićevih poliklonskih anti-galektin-1 antitela na HTR-8/SVneo ćelijskim lizatima. Poliklonska anti-galektin-1 antitela, u koncentraciji od 5, 10 ili 20 µg/mL, prepoznala su galektin-1 monomer (traka od ~14 kDa). Za procenu nespecifičnog vezivanja (NSB) membrane su inkubirane bez prisustva primarnih antitela.

4.3.4. Ispitivanje dijagnostičkog značaja galektina-1: galektin-1 kao biomarker

Dosadašnji rezultati pružili su nove uvide u regulatorne mehanizme značajne za galektine, koji bi dalje mogli da pomognu u razumevanju i tretiranju nekih patoloških stanja. Najviše izučavani galektini, galektin-1 i -3 već neko vreme se spominju kao potencijalni biomarkeri u različitim patološkim stanjima: kardiovaskularnim bolestima, patologiji trudnoće, malignim stanjima, autoimunskim bolestima. Razvijeni ELISA test omogućio je kvantitativno određivanje galektina-1 u biološkom materijalu, čime je otvorio mogućnost za dalja ispitivanja dijagnostičkog potencijala galektina-1. Za pilot-studiju odabrani su pacijenti sa neurološkim oboljenjem *Myasthenia gravis* (MG), jer je ranijim ispitivanjima pokazano da bi galektin-1 mogao učestvovati u patološkom procesu vezanom za nastanak ove bolesti. Pored toga, u lečenju pacijenata obolelih od MG uključeni su i glukokortikoidi. Nivo galektina-1 određen je u serumu zdravih i osoba obolelih od MG. Preliminarni rezultati su pokazali da su vrednosti galektina-1 statistički značajno veće kod pacijenata sa MG (Slika 41).



Slika 41. Razlike između serumskog galektina-1 kod zdravih osoba i pacijenata obolelih od Myasthenia gravis (MG). Izmerene vrednosti galektina-1 u humanom serumu izražene su u arbitrarnim jedinicama (arb U). A) Distribucija vrednosti serumskog galektina-1 kod zdravih osoba i pacijenata sa MG. B) Vrednosti galektina-1 u serumu kod zdravih osoba i pacijenata sa MG predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM.

Diskusija

Procesi implantacije embriona i placentacije obuhvataju složenu interakciju blastociste i endometrijuma, posredovanu brojnim molekulima koji su sekretovani od strane trofoblasta i decidue [Cha i sar., 2012; Staun-Ram i Shalev, 2005; van den Brule i sar., 2005]. Nakon implantacije embriona u tkivo endometrijuma dolazi do invazije EVT dublje u tkivo uterusa čime se uspostavlja fizički kontakt embriona sa organizmom majke. Pored toga, placentacija omogućava i uspostavljanje mehanizama koji obezbeđuju održavanje trudnoće, kao i *in utero* preživljavanje fetusa [Lunghi i sar., 2007]. Brojnim istraživanjima pokazano je da su steroidni hormoni jedni od glavnih regulatora implantacije, placentacije, kao i diferencijacije i invazije trofoblasta [Halasz i Szekeres-Bartho, 2013; Malassine i Cronier, 2002]. Invazija trofoblasta u tkivo majke je strogo regulisan i koordinisan proces. Među molekulima uključenim u invaziju trofoblasta i formiranje placente, nalaze se i galektini, animalni lektini koji ispoljavaju afinitet prema β -galaktozidnoj strukturi [Than i sar., 2012]. Stoga bi identifikacija molekula koji modulišu ekspresiju galektina, omogućila bolje razumevanje procesa implantacije i formiranja placente, što bi doprinelo povećanju uspešnosti humane reprodukcije.

U okviru ovog rada ispitan je uticaj steroidnih hormona P₄, E₂ i TE i sintetskog glukokortikoida DEX, analoga kortizola, kao i uticaj antagonista steroidnih receptora mifepristona, F i I na galektin-1, -3 i -8 u ekstravilusnom trofoblastu *in vitro*. Ispitivanja *in vitro*, na kulturi primarnih ćelija ili kulturi ćelijskih linija određenih karakteristika, predstavljaju pogodnu alternativu za izučavanje procesa implantacije i placentacije. Ispitivanja u ovom radu su vršena na imortalizovanoj trofoblastnoj HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji. Ova ćelijska linija je dobijena transfekcijom EVT čoveka prvog trimestra trudnoće SV40 T antigenom [Graham i sar., 1993] i funkcionalno verno predstavlja ćelije EVT od kojih je inicijalno generisana. Zbog toga je HTR-8/SVneo ćelijska linija pogodan model-sistem za ispitivanje određenih funkcije trofoblasta [Hannan i sar., 2010].

Steroidni hormoni imaju značajnu ulogu tokom trudnoće – omogućavaju uspostavljanje i održavanje trudnoće, adaptaciju organizma majke, razviće i rast fetusa, rast i funkcionisanje placente, kao i iniciranje porođaja [Gambino i sar., 2010; Halasz i Szekeres-Bartho, 2013]. U placenti su prisutni receptori za steroidne hormone, pa tako, osim što se u placenti sintetišu i metabolišu, steroidni hormoni mogu ostvariti i

parakrino delovanje na trofoblast. Pored toga, neretko placenta može biti izložena i jatrogenom delovanju steroidnih hormona. Progesteron je neophodan za uspostavljanje i održavanje trudnoće, pa se preparati P₄ često koriste tokom prvog trimestra u cilju prevencije spontanih pobačaja [Varagić i Milošević, 2002]. Osetljivost na varijacije u nivou P₄ je naročito izražena krajem prvog trimestra, kada placenta, umesto žutog tela, preuzima dominantnu ulogu u sintezi ovog hormona. Pored P₄, u placenti se sintetišu i tri estrogena: E₂, najpotentniji fiziološki estrogen, i njegovi metaboliti estron i estriol, čije je estrogeno delovanje znatno manje izraženo. Pokazano je da pored P₄ i E₂, i glukokortikoidi mogu uticati na trudnoću, pre svega modulacijom sinteze proteina ECM placente. Tako je pokazano da DEX ima izraženiji inhibicioni efekat na sintezu onfFN, LN i integrina u kulturi CTB trećeg trimestra u odnosu na CTB prvog trimestra, i to na nivou iRNK i proteina [Guller i sar., 1994]. Pretpostavlja se da bi različit efekat glukokortikoida na proteine ECM u prvom u odnosu na kraj trećeg trimestra mogao biti od značaja za samu funkciju placente – tokom rane gestacije omogućavanje čvršćeg kontakta sa tkivom uterusa, odnosno kasnije olakšavanje porođaja [Yoon i sar., 1998]. Takođe, sintetski glukokortikoidi se primenjuju u kliničkoj praksi, bilo kao terapija namenjena lečenju majke ili fetusa [Michael i Papageorghiou, 2008]. Primena sintetskih glukokortikoida u slučajevima kada postoji rizik od prevremenog porođaja omogućavaju ubrzano sazrevanje organa fetusa, pre svega pluća. Slično kao i P₄, glukokortikoidi ispoljavaju i imunomodulatorno delovanje. Međutim, bez obzira na široku primenu steroidnih hormona tokom trudnoće, vrlo je mali broj istraživanja koji je ispitivao njihove efekte na molekulskom nivou u samom trofoblastu.

Kako je već pokazano da steroidni hormoni mogu regulisati neke od funkcija EVT u placenti čoveka, u ovom radu je ispitivano da li ovi hormoni mogu uticati na ekspresiju tri člana familije galektina eksprimiranih u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji. Stoga je, pre nego što su HTR-8/SVneo ćelije tretirane steroidnim hormonima, najpre ispitano da li ova ćelijska linija produkuje neki od steroidnih hormona *per se*. Poznato je da endokrinu funkciju u placenti vrši sincicijum, koji sintetiše dva steroidna hormona: P₄, direktno iz holesterola, i E₂, koji nastaje aromatizacijom androgenih hormona sintetisanih u kori nadbubrežnih žlezda majke i fetusa. Sposobnost steroidogeneze ispoljavaju i *in vitro* neke ćelijske linije trofoblastnog porekla. Određivanjem P₄ i E₂ osetljivim RIA testom u kondicioniranim ćelijskim medijumima HTR-8/SVneo ćelija,

ova dva hormona nisu detektovana. Pored toga, u kondicioniranim medijumima nisu detektovani ni androgeni hormoni, kao ni kortizol, što je u skladu sa činjenicom da humana placenta ne sintetise ove hormone [Strauss i sar., 1996]. Kako je poznato da su androgeni hormoni prekursori za sintezu estrogena u placenti čoveka, ispitano je da li HTR-8/SVneo ćelije mogu vršiti konverziju androgena u estrogene. Ustanovljeno je da nakon tretiranja ćelija TE, koji je prekursor za sintezu E_2 tokom 48 sati, HTR-8/SVneo ćelije ne sintetisu E_2 , što je ukazalo da aromataza nije aktivna u ovoj EVT ćelijskoj liniji, pri datim eksperimentalnim uslovima. Slični rezultati su takođe prethodno dobijeni u ranijim istraživanjima naše laboratorije [Bojić-Trbojević i sar., 2008]. Nemogućnost HTR-8/SVneo ćelijske linije da sintetise steroidne hormone je bila očekivana, imajući u vidu da je EVT krajnje diferencirana populacija trofoblasta, koja se odlikuje dominantno migratorno/invazivnim fenotipom.

Ćelije EVT, iako ne sintetisu steroidne hormone, predstavljaju ciljno mesto delovanje steroidnih hormona. Steroidni hormoni svoj efekat uglavnom ostvaruju posredstvom nuklearnih receptora. Prisustvo funkcionalnih receptora za steroidne hormone je pokazano i u HTR-8/SVneo ćelijama: obe izoforme PR (PRA i PRB), obe izoforme GR ($GR\alpha$ i $GR\beta$), kao i $ER\beta$ forma [Biondi i sar., 2007; Bojić-Trbojević i sar., 2008; Cervellati i sar., 2011; Cervellati i sar., 2013; Chan i sar., 2003; Chen i sar., 2012; Gambino i sar., 2010; Liu i sar., 2007].

Nivo proteina u ćelijskoj kulturi zavisi, pre svega, od broja prisutnih ćelija. Kako je efekat steroidnih hormona na galektin-1, -3 i -8 praćen u vremenskom intervalu od 48 sati, prvo je bilo neophodno utvrditi da li P_4 , DEX, RU486, E_2 , I, TE i F u dve ispitivane koncentracije (10 nM i 1000 nM) imaju uticaja na broj živih ćelija, pri datim eksperimentalnim uslovima. Broj živih ćelija je rezultat ravnoteže između ćelijske proliferacije i apoptoze. Primenom kolorimetrijskog MTT testa moguće je na jednostavan način odrediti broj živih ćelija, praćenjem metabolički aktivnih ćelija. Tretman steroidnim hormonima i njihovima antagonistima u ovom radu nije uticao na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija. Slične rezultate dobili su i drugi autori u svojim istraživanjima. Tako su Liu i sar. predložili da bi efekat P_4 na preživljavanje HTR-8/SVneo mogao da se ostvaruje inihibicijom apoptoze [Liu i sar., 2007]. Dok P_4 nije uticao na broj HTR-8/SVneo ćelija, betametazon i RU486 su ispoljili inhibitorski efekat na ćelijsku vijabilnost, ali tek nakon inkubacije od tri dana [Cervellati i sar., 2011].

Druga grupa autora, koristeći takođe HTR-8/SVneo ćelijsku liniju kao model, zaključila je da P₄ ispoljava inhibitorno delovanje na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija, dok E₂ nije pokazao značajan efekat [Chen i sar., 2011]. Međutim, umanjeno preživljavanje ćelija u ovom radu postignuto je tek pri koncentraciji P₄ od 20 µM, što je značajno više od koncentracija korišćenih u ovom radu, i u prisustvu FCS [Chen i sar., 2011]. Takođe, pokazano je da glukokortikoidi mogu uticati na preživljavanje horiokarcinomskih ćelija, pri čemu efekat zavisi od 1) toga da li ćelije ekspimiraju GR i 2) uslova u kojima su gajene [Mandl i sar., 2006]. Tako je triamcinolon, sintetski glukokortikoid, uticao samo na preživljavanje ćelije koje ekspimiraju GR, BeWo i JEG-3. Kako je pokazano da efekat triamcinolona zavisi od uslova u kojima su ćelije gajene, tj. sa ili bez FCS, pretpostavlja se da pored neophodnog prisustva funkcionalnog GR, na glukokortikoidno delovanje utiču i faktori iz seruma [Mandl i sar., 2006; Michael i Papageorghiou, 2008]. Iako postoji nekoliko studija koje su ispitivale uticaj steroidnih hormona na vijabilnost EVT *in vitro*, razlike u dizajnu eksperimenata, pre svega uslovi u kojima su ćelije gajene (sa ili bez FCS), koncentracije steroidnih hormona i vreme tokom koga su ćelije tretirane se razlikuju, tako da se iz dosadašnjih rezultata ne može izvesti jedinstveni zaključak.

Galektini čine brojnu grupu endogenih animalnih lektina [Cummings i Liu, 2009; Leffler i sar., 2004]. Interagujući sa različitim glikokonjugatima učestvuju u brojnim fiziološkim i patološkim procesima [Elola i sar., 2007]. Tako je, između ostalog, pokazano da ovi proteini mogu imati značajnu ulogu u implantaciji i placentaciji, kao i da su potrebni za normalno razviće organizma, kako čoveka, tako i eksperimentalnih životinja [Barrientos i sar., 2014; Poirier, 2002]. Svakako treba imati u vidu da su skoro svi galektini čoveka ekspimirani i u zoni interakcije majke i fetusa [Than i sar., 2012; Than i sar., 2014]. Značaj uloge koju galektini imaju u humanoj reprodukciji potvrđuje i činjenica da su različita stanja povezana sa problemima u implantaciji i održavanju trudnoće kod čoveka povezana sa promenama u ekspresiji galektina [Božić i sar., 2004; Jeschke i sar., 2007; Than i sar., 2008b]. Neka od ovih stanja povezana su i sa promenama u nivoima steroidnih hormona, odnosno prisustvu i aktivnosti receptora za steroidne hormone. Ovo dodatno ističe potrebu da se ispita mogući efekat koji steroidni hormoni mogu imati na ekspresiju galektina. Iako je pokazano da je ekspresija galektina precizno regulisana, da može biti tkivno-specifična, kao i da zavisi od određene faze

razvoja, još uvek ima malo podataka o faktorima koji utiču na ove proteine u trofoblastu. Prethodno je pokazano da EVT prvog trimestra, na genskom i proteinskom nivou, ispoljava tri predstavnika familije galektina: galektin-1, -3 i -8 [Kolundzic i sar., 2011a]. Ipak, još uvek nema dovoljno podataka o faktorima koji utiču na njihovu ekspresiju. Postoji nekoliko osnova za pretpostavku da bi steroidni hormoni, kao jedni od glavnih fizioloških regulatora tokom trudnoće, mogli uticati i na ekspresiju pripadnika familije galektina u placenti. U promotorskim regionima gena za navedena tri galektina, postoje neke od HRE sekvenci, što je neophodan preduslov za genomsko delovanje steroidnih hormona. Pored toga, više studija je pokazalo prisustvo ERE sekvence u promotorskom regionu *LGALS1* gena, koja je u ćelijama trofoblasta evolutivno konzervirana [Bourdeau i sar., 2004; Gao i sar., 2008; Than i sar., 2008c]. Takođe, istarižavanja su pokazala da se tokom menstrualnog ciklusa nivo galektina-1 i -3 u endometrijumu menja, prateći promene u nivou estrogena i P₄ [von Wolff i sar., 2005]. Slična promena u ekspresiji galektina-1 odvija se kod ženki glodara tokom estrusa, a primenom inhibitora ER fulvestranta i inhibitora PR mifepristona, dodatno je potvrđeno da se regulacija ekspresije galektina-1 odvija posredstvom ova dva receptora [Choe i sar., 1997]. Pored endometrijuma i decidue, i u tumorskom tkivu dojke uočen je mogući uticaj E₂ na ekspresiju galektina-1. Tako je primećen niži nivo galektina-1 u ćelijama koje nisu eskprimirale ER [Sahab i sar., 2010]. Pored toga, prisustvo ER i povećana ekspresija galektina-1 u stromi tumora karakteristični su za tumore dojke sa izraženim metastatskim potencijalom [Jung i sar., 2007]. Ekspresija galektina-3 u endometrijumu miša progresivno raste brzo po uspostavljanju trudnoće, što bi takođe moglo biti jedan od odgovora na povećano prisustvo P₄ [Lee i sar., 1998; Phillips i sar., 1996; Yang i sar., 2012]. U decidui miša, ekspresija galektina-1 i -3 je prostorno diferencijalno izražena, što ukazuje da je regulacija ova dva proteina specifična u odnosu na tip ćelija [Lee i sar., 1998; Phillips i sar., 1996]. U drugim sistemima je pokazano da i glukokortikoidi mogu modulirati galektin-1 i -3. Tako je pokazano da DEX utiče na celokupni promet galektina-1 u plućima pacova, i to na nivou transkripcije, translacije i degradacije [Clerch i sar., 1987; Sanford i sar., 1993].

Iako je modulacija ekspresije galektina steroidnim hormonima pokazana u različitim sistemima, ovi uticaji ne moraju nužno biti isti i u trofoblastu. Tokom trudnoće, steroidni hormoni ostvaruju svoje delovanje na različite načine, pa steroidna

modulacija može biti veoma kompleksna. Delovanje steroidnih hormona posredstvom steroidnih receptora, koji su po svojoj funkciji transkripcioni faktori, direktno utiče na nivo ekspresije ciljnih gena [Beato, 1989]. Genska modulacije indukovana steroidnim hormonima svakako nije uniformna, već zavisi od nekoliko osnovnih faktora. Tako, relativno mali broj hormona, ispoljava veoma različite tkivno i organ-specifične efekte. Pre svega, za svaki od steroidnih hormona postoji više različitih tipova receptora, koji opet mogu biti dodatno strukturno modifikovani, što se odražava i na njihovu funkciju. Dalje, tkivnu specifičnost određuje i prisustvo brojnih koaktivatora ili korepresora, tako da isti hormon može ispoljiti stimulatorno delovanje u jednom, a inhibitorno delovanje u drugom tkivu. Pored toga, pokazano je da P_4 i E_2 u trofoblastu mogu ispoljiti i negenomsko delovanje [Gambino i sar., 2010; Gellersen i sar., 2009].

Na osnovu rezultata dobijenih u okviru ovog rada, pokazano je da steroidni hormoni mogu modulirati ekspresiju *LGALS1*, *LGALS3* i *LGALS8* gena u EVT *in vitro*. Najizraženiji efekat na ekspresiju gena za galektin-1 ispoljio je E_2 pri koncentraciji od 10 nM, stimulišući više nego dvostruko ekspresiju *LGALS1* i *LGALS3*, kako u odnosu na kontrolu, tako i u odnosu na tretman E_2 od 1000 nM. Pored toga, E_2 pri koncentraciji od 10 nM je delovao takođe stimulatorno na ekspresiju *LGALS8* gena, pri čemu je efekat bio manje izražen u odnosu na gene za galektin-1 i galektin-3. Ekspresija *LGALS3* gena u horiokarcinomskoj BeWo ćelijskoj liniji je takođe pod uticajem E_2 , ali je stimulatorni efekat postignut tek nakon 72 sata [Yang i sar., 2011]. Ipak, treba imati u vidu, da BeWo ćelijska linija poseduje endogenu steroidogenu aktivnost, za razliku od HTR-8/SVneo ekstravilusnih ćelija. U literaturi postoje podaci o suprotnim efektima niže i više koncentracije E_2 u trofoblastu. Tako je pokazano da niža koncentracija E_2 stimuliše ekspresiju gena za IGFBP-7 u HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji, dok je tretman višom koncentracijom inhibirao ekspresiju IGFBP-7 gena [Liu i sar., 2012]. Slično tome, u BeWo ćelijskoj liniji, ekspresija gena za leptin je stimulirana pri nižim, a smanjena prilikom tretiranja višim koncentracijama E_2 [Gambino i sar., 2010].

Ekspresija *LGALS1* gena, ali ne i *LGALS3* i *LGALS8* gena, je smanjena nakon tretmana 1000 nM DEX. Takođe, obe koncentracije RU486 ispoljile su inhibitorni efekat na ekspresiju gena za galektin-1, ali ne i na gene za druga dva ispitivana galektina. S druge strane, P_4 je smanjivao samo ekspresiju *LGALS1* gena. Imajući u vidu da je GR najzastupljeniji steroidni receptor u placenti prvog trimestra, postoji

moćnost da su ovi efekti uglavnom ostvareni posredstvom GR. Naime, mifepriston može da blokira dejstvo glukokortikoida na nivou receptora [Chan i sar., 2003]. Mifepriston je i parcijalni agonist glukokortikoidnog i PR, pa prema tome on ne mora ispoljavati isključivo suprotne efekte u odnosu na P₄ i glukokortikoide [Lu i sar., 2006]. Agonističko delovanje RU486 nije nepoznato, a između ostalog, pokazano je i kod HTR-8/SVneo ćelija [Cervellati i sar., 2011].

Supresija ekspresije *LGALS1* i *LGALS3* gena je uočena nakon tretmana višim koncentracijama TE i F, pri čemu je efekat flutamida bio izraženiji u odnosu na testosteron. Do danas, prisustvo androgenog receptora u EVT prvog trimestra nije pokazano [Chan i sar., 2003; Uzelac i sar., 2010]. Međutim, ispitivanjem nekih patoloških stanja vezanih za trudnoću, kao što su gestacijski *Diabetes mellitus* ili sindrom policističnih jajnika, pretpostavljeno je da i androgeni hormoni mogu uticati na funkciju trofoblata [Palomba i sar., 2012; Uzelac i sar., 2010]. Androgeni su plejotropni hormoni koji svoj efekat mogu ostvariti genomskim i negenomskim delovanjem, ali mehanizam kojim ostvaruju svoju aktivnost u placenti još uvek nije poznat [Uzelac i sar., 2010].

Osim na genskom nivou ovim radom je praćeno i da li steroidni hormoni moduliraju nivoe galektina-1, -3 i -8 u ekstravilusnoj trofoblastnoj ćelijskoj liniji i na nivou translacije i sekrecije. Efekat steroidnih hormona ne mora nužno biti isti na nivou gena i proteina. Moguće je da isti hormon, pri datim uslovima stimuliše ekspresiju gena, ali ne i sintezu datog proteina, kao i *vice versa*.. Slično kao i na nivou iRNK, sinteza proteina galektina-1, -3 i -8 u HTR-8/SVneo ćelijama podleže uticaju steroidnih hormona. Tako P₄ blago povećava nivo galektina-1, -3 i -8. S druge strane, RU486 ima suprotan, inhibitorni efekat u odnosu na P₄ i najizraženiji efekat ima na nivo galektina-1. Prethodno je već pokazano da je regulacija različitih proteina u trofoblastu i placenti pod parakrinom kontrolom P₄ pri čemu ovaj hormon može ostvariti stimulatorno, ali i inhibitorno delovanje Tako je ekspresija MMP-9 u kulturi ćelija trofoblata prvog trimestra inhibirana P₄ [Bidon i sar., 2001]. S druge strane, nivo osteopontina, komponente placentnog ECM stimulisan je ovim hormonom, dok RU486 smanjuje nivo ovog proteina [Omigbodun i sar., 1997; Pei i sar., 2010]. Prethodni rezultati su pokazali da je nivo galektina-1 u ćelijama trofoblata takođe podložan uticaju P₄, pri čemu je ovaj uticaj zavisio od doze i delimično je inhibiran mifepristonom [Bojić-Trbojević i

sar., 2008]. U BeWo ćelijskoj liniji, Yang i sar. su pratili promenu ekspresije galektina-3 nakon tretiranja ćelija progesteronom, pri čemu, iako je ekspresija gena za galektin-3 bila vremenski i dozno zavisna od P₄, efekat ovog hormona na proteinskom nivou nije bio izražen [Yang i sar., 2011]. Sinteza proteina regulisana je na više nivoa: transkripcionom, posttranskripcionom, translacionom i posttranslacionom. Nivo iRNK ne mora uvek biti u korelaciji sa nivoom proteina, odnosno često ne postoji linearna ekstrapolacija transkriptoma na proteom. Tako su Schwanhäusser i sar. zaključili da je nivo proteina u ćeliji uglavnom regulisan na translacionom nivou [Schwanhausser i sar., 2011]. Promena sinteze proteina unutar ćelije ili promena brzine njegove razgradnje može se odraziti i na nivo proteina sekretovanog van ćelije Sintetski glukokortikoid DEX nije ostvario značajan efekat na galektin-1, -3 i -8 proteinskom nivou u HTR-8/SVneo ćelijama. Za razliku od ove ćelijske linije nivo galektina-1 u horiokarcinomskim ćelijama bio je u zavisnosti od doze i na način specifičan za ćelijsku liniju inhibiran DEX – pri nižim dozama (0,1 i 1 nM DEX) nivo galektina-1 je smanjen u JAr ćelijama, dok je u drugoj ćelijskoj liniji, JEG-3 nivo galektina-1 bio smanjen pri dozi DEX od 100 nM [Bojić-Trbojević i sar., 2010]. Različito ponašanje HTR-8/SVneo, JAr i JEG-3 ćelija može biti posledica ne samo drugačijeg eksperimentalnog pristupa, već i individualnih razlika koje postoje između ovih ćelijskih linija, u pogledu ekspresije receptora i steroidogene aktivnosti, kao i ekspresije galektina-1. Guller i saradnici su serijom eksperimenata ispitali uticaj steroidnih hormona na ekspresiju proteina ECM, pri čemu su pokazali da je regulacija pojedinih proteina steroid specifična [Guller i sar., 1993a; Guller i sar., 1994; Guller i sar., 1993b; Ryu i sar., 1999; Yoon i sar., 1998]. Iako nivo ukupnih proteina u ćelijama trofoblasta nije bio promenjen, nivo određenih proteina je varirao pod uticajem DEX, ali ne i drugih steroidnih hormona [Guller i sar., 1993a]. Dabelić i sar. su pokazali da je ekspresija galektina-3 u kulturi makrofaga podložna delovanju glukokortikoida, pri čemu glukokortikoidi ostvaruju diferencijalnu modulaciju ekspresije ovog galektina na nivou transkriptoma i genoma [Dabelic i sar., 2006]. Deksametazon i hidrokortizon inicijalno su inhibirali ekspresiju galektina-3, i na nivou iRNK i na nivou proteina. Međutim, nakon 48 sati ekspresija iRNK je ponovo postizala bazalni nivo. Suprotno tome, u istom vremenskom intervalu izlaganje ćelija DEX i hidrokortizonu stimulisalo je sintezu proteina. Pored toga, izraženiji efekat je ostvaren primenom nižih doza DEX u

poređenju sa višim. Može se pretpostaviti da glukokortikoidi svoje delovanje ostvaruju različitim mehanizmima, što pruža mogućnost da se njihov efekat manifestuje u zavisnosti od tipa ćelija.

Galektini ne poseduju signalnu sekvencu neophodnu za njihovo sekretovanje, ali se mogu neklasičnim putem oslobađati van ćelije [Hughes, 1999; Nickel, 2005]. Njihovo oslobađanje van ćelije najvećim delom zavisi od interakcije sa odgovarajućim glikopartnerima [Seelenmeyer i sar., 2005]. Sekretacija galektina je ispitivana u različitim ćelijskim tipovima. Tako je pokazano da ćelije glioma, mezenhimske stromalne ćelije, ćelije karcinoma kolona, ćelije skvamoznog karcinoma glave i vrata sekretuju galektin-1 [Gieseke i sar., 2010; Le i sar., 2005; Satelli i sar., 2008]. Kako galektinski profil EVT čine galektin-1, -3 i -8, u ovom radu je najpre ispitana sposobnost HTR-8/SVneo ćelija da sekretuju neki od prisutnih galektina. Imunoblotom je utvrđeno da HTR-8/SVneo ćelije sekretuju u medijum sva tri prisutna galektina. Galektin-1 je detektovan u medijumu HTR-8/SVneo ćelija kao protein mase 14,6 kDa. U medijumu su upotrebom anti-galektin-3 antitela detektovane tri trake molekulskih masa 31 kDa, 33 kDa i 66 kDa, dok su upotrebom anti-galektin-8 antitela detektovane dve trake mase 31 kDa i 66 kDa. S druge strane, u ćelijskom lizatu HTR-8/SVneo ćelija detektovani su galektin-3 kao protein mase 30 kDa i galektin-8 mase 36 kDa [Kolundzic i sar., 2011a]. Uočene razlike u formama galektina-3 i -8 u medijumu u odnosu na HTR-8/SVneo ćelijski lizat, ukazuju na mogućnost da je za njihovu sekreciju potrebna post-translaciona modifikacija i/ili vezivanje glikoliganda. Razlike u molekulskim masama unutar- i vanćelijskog galektina-8 su takođe primećene u ćelijskoj liniji humanog karcinoma pluća 1299 [Hadari i sar., 2000]. Kada je utvrđeno da HTR-8/SVneo ćelije oslobađaju galektine, ispitivan je i uticaj steroidnih hormona i njihovih antagonista na sekreciju galektina. Slično kao i na nivou iRNK i ukupnih proteina, i sekrecija ovih galektina je osetljiva na tretman steroidnim hormonima i njihovim antagonistima. Dok samo E₂ stimuliše sekreciju sva tri prisutna galektina, niža koncentracija P₄ stimuliše oslobađanje galektina-3 i -8. Pored toga, dobijeni rezultati su pokazali da je sekrecija galektina-8 najviše podložna uticaju steroidnih hormona. U literaturi je malo dostupnih podataka o molekulima koji utiču na sekreciju galektina. Pokazano je da hipoksija utiče na oslobađanje galektina-1 u ćelijama skvamoznog karcinoma glave i vrata [Le i sar., 2005]. U BeWo ćelijama sekrecija galektina-3 je stimulisana E₂, P₄ i hCG [Yang i sar.,

2011]. O regulaciji sekrecije galektina-8 se vrlo malo zna. U kulturama ćelija karcinoma pluća, natrijum butirat inhibirao je ekspresiju galektina-8 na transkripcionom nivou, ali promene na nivou unutarćelijske lokalizacije ili sekrecije nisu uočene [Bidon i sar., 2001]. Rezultati dobijeni u okviru ovog rada ukazuju na precizno i selektivno regulisanje oslobađanja galektina u trofoblastu. Pored toga, steroidni hormoni regulišu i ekspresiju proteina koje mogu vezivati galektini trofoblasta, od kojih su neki neophodni za sekreciju galektina. Stoga, može se pretpostaviti da steroidni hormoni mogu uticati na sekreciju delujući direktno na same galektine ili indirektno, menjajući nivo odgovarajućih vezujućih proteina.

U okviru ovog rada ispitivan je i uticaj steroidnih hormona na funkcionalna svojstva EVT u *in vitro* uslovima. Invazivnost je zajedničko svojstvo EVT i tumorskog tkiva, pa se može reći da trofoblast na neki način predstavlja „fiziološku metastazu“ [Ferretti i sar., 2007; Lala i sar., 2002]. Za razliku od malignog tkiva, invazija trofoblasta je precizno regulisana i kontrolisana, vremenski je ograničena na prvi trimestar, i prostorno na invaziju u endometrijum i unutrašnju trećinu miometrijuma. Ćelijska invazija obuhvata nekoliko faza – odvajanje ćelija od matičnog tkiva, interakciju ćelija sa komponentama ECM, razgradnju ECM delovanjem proteolitičkih enzima, migraciju ćelija kroz ECM. U proces invazije trofoblasta u tkivo decidue uključeni su mnogi faktori koji omogućavaju interakciju EVT sa okolnim ECM, kao i razgradnju ECM, čime se omogućava prostor za dalje prodiranje EVT u decidualno tkivo [Loke i King, 1995]. Pokazano je da su lektinske interakcije od značaja tokom inicijalnog kontakta blastociste sa površinom endometrijuma, ali i da od njih može zavisi invazija EVT [Jones i Aplin, 2009]. Uticaj E_2 na migratorna svojstva HTR-8/SVneo ćelija ispitan je primenom *wound healing* metode. Dobijeni rezultati su pokazali da niža koncentracija E_2 značajno smanjuje migraciju HTR-8/SVneo ćelija. Slično, E_2 je ispoljio i inhibitorni efekat i na invaziju ćelija, pri čemu je supresija invazije postignuta pri obe ispitivane koncentracije. Kako je pokazano da E_2 ne utiče na preživljavanje HTR-8/SVneo ćelija, supresija migracije i invazije HTR-8/SVneo ćelija zaista je rezultat uticaja E_2 . Prethodno je pokazano da invazija trofoblasta zavisi od delovanja P_4 , ali i da glukokortikoidi takođe imaju uticaja [Bojić-Trbojević i sar., 2008; Chen i sar., 2011]. Inhibitorno delovanje P_4 na invaziju trofoblasta delimično se može objasniti inhibicijom aktivnosti MMP-2 i -9, ključnih proteolitičkih enzima trofoblasta

[Goldman i Shalev, 2006; Shimonovitz i sar., 1998]. Postojeći podaci u literaturi koji se odnose na uticaj estrogena na invazivnost trofoblasta nisu konzistentni. Chen i saradnici, koristeći takođe HTR-8/SVneo ćelijsku liniju kao model, nisu našli da se invazija trofoblasta menja pod uticajem E_2 , iako je utvrđeno da ove ćelije preuzimaju E_2 iz okolnog medijuma [Chen i sar., 2011]. Druga grupa autora, koristeći takođe ovu ćelijsku liniju kao model, nije pratila direktan uticaj E_2 na invazivnost trofoblasta, ali je pokazala da E_2 simulira ekspresiju IGFBP-7, koji pak deluje inhibitorno na migraciju [Liu i sar., 2012]. Inhibitorno delovanje estrogenih hormona na trofoblast pokazan je i *in vivo*. Pepe i Albrecht su serijom eksperimenata na babunima demonstrirali uticaj estrogena na funkciju trofoblasta [Albrecht i sar., 2006; Bonagura i sar., 2012; Bonagura i sar., 2008]. Tokom gestacije nivo sinteze i koncentracije estrogena rastu, što bi moglo biti od značaja za na funkciju trofoblalsta. Porast E_2 tokom gestacije smanjuje prodiranje trofoblasta u tkivo majke. Slično, i tokom humane trudnoće, invazija trofoblasta se zaustavlja na prelasku prvog u drugi trimestar. Kako invazija trofoblasta zavisi od ravnoteže između faktora koji je stimulišu odnosno suprimiraju, pretpostavlja se da bi niža i viša koncentracija E_2 koje odgovaraju koncentracijama ovog hormona tokom prvog, odnosno trećeg trimestra, mogle ostvariti različite fiziološke uloge tokom gestacije.

Placentni galektin-1 je prvi galektin izolovan i okarakterisan kod čoveka [Hirabayashi i Kasai, 1984]. U ovom radu placenta nakon porođaja je takođe poslužila kao izvor za izolovanje galektina-1. Standardna procedura za izolovanje galektina-1 zasniva se na osnovnom svojstvu, lektinskoj aktivnosti, pa laktozna ekstrakcija iz tkiva i afinitetno prečišćavanje na koloni predstavljaju pouzdan metod za dobijanje čistog preparata galektina-1. U placenti trećeg trimestra su pored galektina-1, prisutni i drugi članovi galektinske familije koji vezuju iste ugljenohidratne komponente kao i galektin-1. Međutim, na ovaj način se izoluje samo galektin-1, što je verovatno posledica manje zastupljenosti ostalih galektina u odnosu na galektin-1 u placenti trećeg trimestra. Nakon izolovanja iz tkiva i prečišćavanja, karakterizacija galektina izvršena je primenom SDS-PAGE, imunoblota i MS. Ovim metodama je pokazano da je izolovan protein mase ~ 14,6 kDa, koga su specifično prepoznala antitela prema galektinu-1. Izolovani placentni galektin-1 takođe je zadržao svoja funkcionalna svojstva, što je pokazano lektinskim testom na čvrstoj fazi i testovima hemaglutinacije. Analiza

placentnog galektina-1 primenom SELDI-TOF MS, omogućila je detekciju molekularnih formi ovog lektina. Poređenjem izolovanog galektina-1 sa rekombinantnim humanim galektinima, od kojih jedan predstavlja redukovani lektin (rhgal-1), a drugi oksidovanu formu (Ox-rhgal-1) uočeno je da izolovani lektin sadrži obe forme. Poznato je da biološka aktivnost galektina-1 zavisi od njegove molekulske forme, odnosno od lektinskih svojstava. Redukovana forma galektina-1 ima lektinsku aktivnost i odgovorna je za adheziju ćelija glatke muskulature i imunomodularnu funkciju [Camby i sar., 2006; Moiseeva i sar., 1999]. S druge strane, oksidovana forma galektina-1 ima drugačiju funkcionalnu aktivnost i identifikovana je kao faktor regeneracije perifernih nerava [Inagaki i sar., 2000]. U trofoblastu *in vitro* galektin-1 stimuliše invaziju, ali se taj uticaj ostvaruje prvenstveno njegovom lektinskom aktivnošću [Kolundzic i sar., 2011a]. Međutim, dalja ispitivanja su neophodna da bi se utvrdilo kako promena redoks statusa galektina-1 može uticati na biološke funkcije ovog lektina u trofoblastu. Takođe ostaje da se identifikuju sve molekulske forme placentnog galektina-1.

Izolovani placentni galektin-1 je dalje upotrebljen za imunizaciju kunića i dobijanje poliklonskih antitela prema galektinu-1. Dobijena prečišćena antitela su specifično vezivala izolovani galektin-1, kao i ovaj lektin prisutan u HTR-8/SVneo ćelijskom lizatu. Poliklonska antitela dobijena u laboratoriji INEP-a specifično prepoznaju galektin-1 i upotrebljena su dalje za formiranje ELISA testa za određivanje koncentracije galektina-1 u biološkom materijalu. U ovom radu je ispitivana moguća promena koncentracije galektina-1 u serumu pacijenata obolelih od autoimunog neurološkog oboljenja *Myasthenia gravis* (MG). Pretpostavljeno je da su promene u ekspresiji galektina-1 u timusu povezane sa nastankom bolesti, ali galektin-1 nije određivan u serumu pacijenata obolelih od MG [Hafer-Macko i sar., 1996]. Preliminarni rezultati su pokazali povećane vrednosti galektina-1 kod pacijenata obolelih od MG u odnosu na zdravu populaciju. Kako je pokazano da je galektin-1 uključen u različite patofiziološke procese, nedavno je počeo da se ispituje značaj ovog lektina kao biomarkera [Ouyang i sar., 2013; Saussez i sar., 2008; Watanabe i sar., 2011]. Tako je pokazano da je praćenje nivoa galektina-1 značajno za određivanje rizika u ranoj fazi sistemske skleroze i razvoju vaskulopatije [Yanaba i sar., 2014]. Pored toga, galektin-1 je praćen i kao biomarker u nekim patološkim stanjima vezanim za trudnoću. Nakon spontanog pobačaja u prvom trimestru trudnoće u serumu pacijentkinja uočeno je

smanjenje nivoa galektina-1 [Tirado-Gonzalez i sar., 2013]. Galektin-1 je određivan i u serumu žena sa preeklampsijom. Međutim, dobijeni rezultati su protivrečni. Tako, prema Molvarec i sar., koncentracija galektina-1 u serumu nije promenjena u preeklampsiji, dok su rezultati druge grupe autora pokazali da dolazi do smanjenja koncentracije ovog lektina u serumu pacijentkinja kod kojih se javila preeklampsija [Freitag i sar., 2013; Molvarec i sar., 2011]. Iako je galektin-1 ispitivan kao biomarker u različitim bolestima, još uvek nije poznato da li su promene nivoa galektina-1 u perifernoj cirkulaciji uzrok ili posledica patofiziološkog procesa.

Rezultati dobijeni u okviru ovog rada pružaju nova saznanja o steroidnim hormonima kao modulatorima galektina u ekstravilusnom trofoblastu *in vitro* na nivou genske transkripcije, translacije i sekrecije. Može se pretpostaviti da bi modulacija nivoa galektina-1, -3 i -8 steroidnim hormonima mogla predstavljati jedan od načina kontrole biološke uloge koju galektini ostvaruju u placenti. Samim tim, pružaju se mogućnosti za dalje ispitivanje regulacije galektina steroidnim hormonima, pre svega u kliničkom kontekstu vezano za problem neuspešne implantacije ili patologije placentе.

Zaključci

- HTR-8/SVneo ćelije ne poseduju sposobnost sinteze steroidnih hormona.
- HTR-8/SVneo ćelije sekretuju sva tri ispitivana galektina.
- Galektini-1, -3 i -8 u ekstravilusnoj ćelijskoj liniji trofoblasta prvog trimestra HTR-8/SVneo su modulirani steroidnim hormonima, zavisno od doze i steroid specifično.
- Steroidni hormoni ispoljavaju iste ili različite efekte na nivou iRNK, ćelijskih galektina i sekretovanih galektina-1, -3 i -8 u ekstravilusnom trofoblastu *in vitro*.
- Niža koncentracija E₂ (10 nM) stimuliše, a viša (1000 nM) inhibira ekspresiju *LGALS1* gena, nivo ukupnog i sekreciju galektina-1.
- Nivo galektina-3 i njegova sekrecija su stimulisani P₄ (10 nM).
- Mifepriston ima suprotan efekat na nivo proteina galektina-1 i -3 u odnosu na P₄ što ukazuje na efekte posredovane PR.
- Ekspresija *LGALS8* gena i nivo proteina galektina-8 su najmanje podložni uticaju steroidnih hormona.
- Progesteron, DEX i E₂ (10 nM) stimulišu oslobađanje galektina-8.
- Estradiol nezavisno od doze inhibira migratorna i invazivna svojstva EVT *in vitro*.
- Izolovani placentni galektin-1 je zadržao lektinska i imunogena svojstva.
- Poliklonska antitela dobijena imunizacijom kunića izolovanim placentnim galektinom-1 pokazuju specifičnost prema galektinu-1 iz različitih bioloških uzoraka.
- ELISA test omogućava određivanje galektina-1 u humanom serumu.
- Galektin-1 može poslužiti kao biomarker u nekim patološkim stanjima.

Literatura

http://www.sabiosciences.com/chipqpcrsearch.php?gene=LGALS3&factor=Over+200+TF&species_id=0&ninfo=n&ngene=n&nfactor=y datum citiranja 21.11. 2014.

http://www.sabiosciences.com/chipqpcrsearch.php?gene=LGALS8&species_id=0&factor=Over+200+TF&ninfo=n&ngene=n&nfactor=n datum citiranja 21.11. 2014.

Albrecht ED, Pepe GJ. Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr Rev.* 1990;11(1):124-50.

Albrecht ED, Pepe GJ. Central integrative role of oestrogen in modulating the communication between the placenta and fetus that results in primate fetal-placental development. *Placenta.* 1999;20(2-3):129-39.

Albrecht ED, Bonagura TW, Burleigh DW, Enders AC, Aberdeen GW, Pepe GJ. Suppression of extravillous trophoblast invasion of uterine spiral arteries by estrogen during early baboon pregnancy. *Placenta.* 2006;27(4-5):483-90.

Aplin JD. Expression of integrin alpha 6 beta 4 in human trophoblast and its loss from extravillous cells. *Placenta.* 1993;14(2):203-15.

Aplin JD, Spanswick C, Behzad F, Kimber SJ, Vićovac L. Integrins beta 5, beta 3 and alpha v are apically distributed in endometrial epithelium. *Mol Hum Reprod.* 1996;2(7):527-34.

Aplin JD, Meseguer M, Simon C, Ortiz ME, Croxatto H, Jones CJ. MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochem Soc Trans.* 2001;29:153-6.

Aspillaga MO, Whittaker PG, Grey CE, Lind T. Endocrinologic events in early pregnancy failure. *Am J Obstet Gynecol.* 1983;147(8):903-8.

Atay S, Gercel-Taylor C, Kesimer M, Taylor DD. Morphologic and proteomic characterization of exosomes released by cultured extravillous trophoblast cells. *Exp Cell Res.* 2011;317(8):1192-202.

Babischkin JS, Pepe GJ, Albrecht ED. Developmental expression of placental trophoblast P-450 cholesterol side-chain cleavage, adrenodoxin and delta 5-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase messenger ribonucleic acids during baboon pregnancy. *Placenta.* 1996;17(8):595-602.

Babischkin JS, Pepe GJ, Albrecht ED. Estrogen regulation of placental P-450 cholesterol side-chain cleavage enzyme messenger ribonucleic acid levels and activity during baboon pregnancy. *Endocrinology.* 1997;138(1):452-9.

Baggia S, Albrecht ED, Pepe GJ. Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the baboon placenta by estrogen. *Endocrinology.* 1990;126(5):2742-8.

Bahn RS, Worsham A, Speeg KV, Jr., Ascoli M, Rabin D. Characterization of steroid production in cultured human choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981;52(3):447-50.

Barbieri RL, Gochberg J, Ryan KJ. Nicotine, cotinine, and anabasine inhibit aromatase in human trophoblast in vitro. *J Clin Invest.* 1986;77(6):1727-33.

Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cumfings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell.* 1994a;76(4):597-8.

Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem.* 1994b;269(33):20807-10.

Barrientos G, Freitag N, Tirado-Gonzalez I, Unverdorben L, Jeschke U, Thijssen VL, Blois SM. Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future. *Hum Reprod Update.* 2014;20(2):175-93.

Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* 1989;56(3):335-44.

Beaudoin C, Blomquist CH, Bonenfant M, Tremblay Y. Expression of the genes for 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and cytochrome P450_{scc} during syncytium formation by human placental cytotrophoblast cells in culture and the regulation by progesterone and estradiol. *J Endocrinol.* 1997a;154(3):379-87.

Beaudoin C, Bonenfant M, Tremblay Y. Regulation of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase type 1 and estradiol-17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA levels by calcium in human choriocarcinoma JEG-3 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1997b;133(1):63-71.

Benediktsson R, Calder AA, Edwards CR, Seckl JR. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997;46(2):161-6.

Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. *Pathology of the Human Placenta*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2012.

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):2496-500.

Bevan BH, Kilpatrick DC, Liston WA, Hirabayashi J, Kasai K. Immunohistochemical localization of a beta-D-galactoside-binding lectin at the human maternofetal interface. *Histochem J.* 1994;26(7):582-6.

Bidon-Wagner N, Le Pennec JP. Human galectin-8 isoforms and cancer. *Glycoconj J*. 2004;19(7-9):557-63.

Bidon N, Brichory F, Thomas D, Cavalier A, Caulet-Maugendre S, Bourguet P, Dazord L. Sodium butyrate induces growth inhibition and modulates galectin-8 expression in human lung carcinoma cells. *Anticancer Res*. 2001;21(2A):1049-55.

Billiar RB, Pepe GJ, Albrecht ED. Immunocytochemical identification of the oestrogen receptor in the nuclei of cultured human placental syncytiotrophoblasts. *Placenta*. 1997;18(4):365-70.

Biondi C, Pavan B, Dalpiaz A, Medici S, Lunghi L, Vesce F. Expression and characterization of vitamin C transporter in the human trophoblast cell line HTR-8/SVneo: effect of steroids, flavonoids and NSAIDs. *Mol Hum Reprod*. 2007;13(1):77-83.

Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA, Arck PC. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med*. 2007;13(12):1450-7.

Blois SM, Barrientos G. Galectin signature in normal pregnancy and preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2014;101-102:127-34.

Bojić-Trbojević Ž, M. J, Lj. V. Influence of IGF-I on adhesion, proliferation, and galectin-1 production in JAr and Jeg-3 choriocarcinoma cell lines. *Arch Oncol*. 2005;13(1):7-10.

Bojić-Trbojević Ž, Božić M, Vićovac L. Steroid hormones modulate galectin-1 in the trophoblast HTR-8/SVneo cell line. *Arch Biol Sci*. 2008;60:11-23.

Bojić-Trbojević Ž, Kolundžić N, Petronijević M, Vićovac L. Choriocarcinoma cell line Response to Dexamethasone. *Journal of Medical Biochemistry*. 2010;29(2):107.

Bonagura TW, Pepe GJ, Enders AC, Albrecht ED. Suppression of extravillous trophoblast vascular endothelial growth factor expression and uterine spiral artery invasion by estrogen during early baboon pregnancy. *Endocrinology*. 2008;149(10):5078-87.

Bonagura TW, Babischkin JS, Aberdeen GW, Pepe GJ, Albrecht ED. Prematurely elevating estradiol in early baboon pregnancy suppresses uterine artery remodeling and expression of extravillous placental vascular endothelial growth factor and alpha1beta1 and alpha5beta1 integrins. *Endocrinology*. 2012;153(6):2897-906.

Boomsma CM, Macklon NS. Does glucocorticoid therapy in the peri-implantation period have an impact on IVF outcomes? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2008;20(3):249-56.

Boomsma CM, Keay SD, Macklon NS. Peri-implantation glucocorticoid administration for assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;6:Cd005996.

Bourdeau V, Deschenes J, Metivier R, Nagai Y, Nguyen D, Bretschneider N, Gannon F, White JH, Mader S. Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinol.* 2004;18(6):1411-27.

Bowen JA, Bazer FW, Burghardt RC. Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophectoderm *in vivo*. *Biol Reprod.* 1996;55(5):1098-106.

Bowen JA, Hunt JS. The role of integrins in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000;223(4):331-43.

Boyd JD, Hamilton WJ. *The Human Placenta*. Cambridge: Heffer & Sons; 1970.

Božić M, Petronijević M, Milenković S, Atanacković J, Lazić J, Vićovac L. Galectin-1 and galectin-3 in the trophoblast of the gestational trophoblastic disease. *Placenta.* 2004;25(10):797-802.

Božić M. Karakterizacija fenotipa invazivnog trofoblasta gestacijskih trofoblastnih bolesti *in situ* i *in vitro* - ekspresija galektina-1 i galektina-3 [Magistarska teza]: Beograd; 2003.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Brayman MJ, Julian J, Mulac-Jericevic B, Conneely OM, Edwards DP, Carson DD. Progesterone receptor isoforms A and B differentially regulate MUC1 expression in uterine epithelial cells. *Mol Endocrinol.* 2006;20(10):2278-91.

Bukovsky A, Cekanova M, Caudle MR, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC, Elder RF. Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003a;1:13.

Bukovsky A, Caudle MR, Cekanova M, Fernando RI, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC, Elder RF. Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant--comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in

asymmetric division and differentiation of estrogen-dependent cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003b;1:36.

Burton GJ, Jauniaux E, Watson AL. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181(3):718-24.

Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(6):2954-9.

Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. *Placenta.* 2007;28 Suppl A:S64-9.

Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* 2006;16(11):137r-57r.

Campbell S, Swann HR, Seif MW, Kimber SJ, Aplin JD. Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. *Hum Reprod.* 1995;10(6):1571-8.

Carlsson MC, Balog CI, Kilsgard O, Hellmark T, Bakoush O, Segelmark M, Ferno M, Olsson H, Malmstrom J, Wuhrer M, Leffler H. Different fractions of human serum glycoproteins bind galectin-1 or galectin-8, and their ratio may provide a refined biomarker for pathophysiological conditions in cancer and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(9):1366-72.

Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. Embryo implantation. *Dev Biol.* 2000;223(2):217-37.

Cervellati F, Pavan B, Lunghi L, Manni E, Fabbri E, Mascoli C, Biondi C, Patella A, Vesce F. Betamethasone, progesterone and RU-486 (mifepristone) exert similar effects on connexin expression in trophoblast-derived HTR-8/SVneo cells. *Reprod Fertil Dev.* 2011;23(2):319-28.

Cervellati F, Valacchi G, Lunghi L, Fabbri E, Valbonesi P, Marci R, Biondi C, Vesce F. 17-beta-Estradiol counteracts the effects of high frequency electromagnetic fields on trophoblastic connexins and integrins. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:280850.

Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med.* 2012;18(12):1754-67.

Chan CC, Lao TT, Ho PC, Sung EO, Cheung AN. The effect of mifepristone on the expression of steroid hormone receptors in human decidua and placenta: a randomized placebo-controlled double-blind study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(12):5846-50.

Chen JZ, Wong MH, Brennecke SP, Keogh RJ. The effects of human chorionic gonadotrophin, progesterone and oestradiol on trophoblast function. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;342(1-2):73-80.

Chen JZ, Sheehan PM, Brennecke SP, Keogh RJ. Vessel remodelling, pregnancy hormones and extravillous trophoblast function. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;349(2):138-44.

Chiariotti L, Salvatore P, Benvenuto G, Bruni CB. Control of galectin gene expression. *Biochimie.* 1999;81(4):381-8.

Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J.* 2004;19(7-9):441-9.

Cho M, Cummings RD. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. *J Biol Chem.* 1995a;270(10):5198-206.

Cho M, Cummings RD. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis. *J Biol Chem.* 1995b;270(10):5207-12.

Choe YS, Shim C, Choi D, Lee CS, Lee KK, Kim K. Expression of galectin-1 mRNA in the mouse uterus is under the control of ovarian steroids during blastocyst implantation. *Mol Reprod Dev.* 1997;48(2):261-6.

Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 1993;15(3):532-4, 6-7.

Clerch LB, Whitney PL, Massaro D. Rat lung lectin synthesis, degradation and activation. Developmental regulation and modulation by dexamethasone. *Biochem J.* 1987;245(3):683-90.

Clever U, Karlson P. Induktion von puff-veränderungen in den speicheldrüsenchromosomen von *Chironomus tentans* durch Ecdyson. *Exp Cell Res.* 1960;20:623-6.

Cole LA. Human chorionic gonadotropin tests. *Expert Rev Mol Diagn.* 2009;9(7):721-47.

Colnot C, Fowles D, Ripoché MA, Bouchaert I, Poirier F. Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice. *Dev Dyn.* 1998;211(4):306-13.

Compagno D, Jaworski FM, Gentilini L, Contrufo G, Gonzalez Perez I, Elola MT, Pregi N, Rabinovich GA, Laderach DJ. Galectins: major signaling modulators inside and outside the cell. *Curr Mol Med.* 2014;14(5):630-51.

Cooper DN, Baronides SH. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol.* 1990;110(5):1681-91.

Cronier L, Alsat E, Hervé J, Délèze J, Malassiné A. Dexamethasone stimulates gap junctional communication, peptide hormones production and differentiation in human term trophoblast. *Placenta.* 1998;19:35-49.

Cronier L, Guibourdenche J, Niger C, Malassine A. Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast. *Placenta.* 1999;20(8):669-76.

Csapo AI, Pulkkinen MO, Ruttner B, Sauvage JP, Wiest WG. The significance of the human corpus luteum in pregnancy maintenance. I. Preliminary studies. *Am J Obstet Gynecol.* 1972;112(8):1061-7.

Csapo AI, Pulkkinen MO, Wiest WG. Effects of luteectomy and progesterone replacement therapy in early pregnant patients. *Am J Obstet Gynecol.* 1973;115(6):759-65.

Cummings RD, Liu FT. Galectins. U: Varki, A, Cummings, RD, Esko, JD, Freeze, HH, Stanley, P, Bertozzi, CR, Hart, GW, Etzler, ME, editors. *Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California; 2009.

Čuperlović M, Janković M, Pfeifer K, Müller WEG. Isolation and Characterization of a β -Galactoside-Binding Protein (14 kD) from Rat Liver Nuclei. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 1995;5(1):33-44.

Dabelic S, Supraha S, Dumic J. Galectin-3 in macrophage-like cells exposed to immunomodulatory drugs. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760(4):701-9.

Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):773-81.

Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest.* 1992;89(1):210-22.

Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development.* 1994;120(12):3657-66.

Damsky CH, Schick SF, Klimanskaya I, Stephens L, Zhou Y, Fisher S. Adhesive interactions in peri-implantation morphogenesis and placentation. *Reprod Toxicol*. 1997;11(2-3):367-75.

Dang ZC, Lowik CW. Removal of serum factors by charcoal treatment promotes adipogenesis via a MAPK-dependent pathway. *Mol Cell Biochem*. 2005;268(1-2):159-67.

de Ziegler D, Fanchin R, de Moustier B, Bulletti C. The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone. *J Reprod Immunol*. 1998;39(1-2):149-66.

Denker HW. Implantation: a cell biological paradox. *J Exp Zool*. 1993;266(6):541-58.

Diczfalusy E. Endocrine functions of the human fetoplacental unit. *Fed Proc*. 1964;23:791-8.

Dorr HG, Heller A, Versmold HT, Sippell WG, Herrmann M, Bidlingmaier F, Knorr D. Longitudinal study of progestins, mineralocorticoids, and glucocorticoids throughout human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;68(5):863-8.

Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, Rabinovich GA. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(13):1679-700.

Escobar JC, Patel SS, Beshay VE, Suzuki T, Carr BR. The human placenta expresses CYP17 and generates androgens de novo. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(5):1385-92.

Fatemi HM, Popovic-Todorovic B. Implantation in assisted reproduction: a look at endometrial receptivity. *Reprod Biomed Online*. 2013;27(5):530-8.

Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking AP, Bellet D. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum Reprod Update*. 2007;13(2):121-41.

Fornstedt N, Porath J. Characterization studies on a new lectin found in seeds of *Vicia ervilia*. *FEBS Lett*. 1975;57(2):187-91.

Freitag N, Tirado-Gonzalez I, Barrientos G, Herse F, Thijssen VL, Weedon-Fekjaer SM, Schulz H, Wallukat G, Klapp BF, Nevers T, Sharma S, Staff AC, Dechend R, Blois SM. Interfering with Gal-1-mediated angiogenesis contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(28):11451-6.

Gambino YP, Maymo JL, Perez-Perez A, Duenas JL, Sanchez-Margalet V, Calvo JC, Varone CL. 17Beta-estradiol enhances leptin expression in human placental cells through genomic and nongenomic actions. *Biol Reprod.* 2010;83(1):42-51.

Gao H, Falt S, Sandelin A, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K. Genome-wide identification of estrogen receptor alpha-binding sites in mouse liver. *Mol Endocrinol.* 2008;22(1):10-22.

Gardner D, Shoback D. Greenspan's Basic ; Clinical Endocrinology: Eighth Edition: McGraw-Hill Companies, Incorporated; 2007.

Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood.* 2007;109(5):2058-65.

Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med.* 2007;25(6):445-53.

Gellersen B, Fernandes MS, Brosens JJ. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum Reprod Update.* 2009;15(1):119-38.

Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science.* 1997;277(5332):1669-72.

Gieseke F, Bohringer J, Bussolari R, Dominici M, Handgretinger R, Muller I. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood.* 2010;116(19):3770-9.

Gitt MA, Barondes SH. Genomic sequence and organization of two members of a human lectin gene family. *Biochemistry.* 1991;30(1):82-9.

Goldman S, Shalev E. Difference in progesterone-receptor isoforms ratio between early and late first-trimester human trophoblast is associated with differential cell invasion and matrix metalloproteinase 2 expression. *Biol Reprod.* 2006;74(1):13-22.

Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem.* 1949;177(2):751-66.

Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res.* 1993;206(2):204-11.

Graves JC, Miller KE, Sellers AD. Maternal serum triple analyte screening in pregnancy. *Am Fam Physician.* 2002;65(5):915-20.

- Grimes RW, Pepe GJ, Albrecht ED. Regulation of human placental trophoblast low-density lipoprotein uptake in vitro by estrogen. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(7):2675-9.
- Guardia CM, Caramelo JJ, Trujillo M, Mendez-Huergo SP, Radi R, Estrin DA, Rabinovich GA. Structural basis of redox-dependent modulation of galectin-1 dynamics and function. *Glycobiology.* 2014;24(5):428-41.
- Guller S, LaCroix NC, Kirkun G, Wozniak R, Markiewicz L, Wang EY, Kaplan P, Lockwood CJ. Steroid regulation of oncofetal fibronectin expression in human cytotrophoblasts. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993a;46(1):1-10.
- Guller S, Wozniak R, Krikun G, Burnham JM, Kaplan P, Lockwood CJ. Glucocorticoid suppression of human placental fibronectin expression: implications in uterine-placental adherence. *Endocrinology.* 1993b;133(3):1139-46.
- Guller S, Markiewicz L, Wozniak R, Burnham JM, Wang EY, Kaplan P, Lockwood CJ. Developmental regulation of glucocorticoid-mediated effects on extracellular matrix protein expression in the human placenta. *Endocrinology.* 1994;134(5):2064-71.
- Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*: Elsevier Saunders; 2006.
- Gwynne JT, Strauss JF, 3rd. The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev.* 1982;3(3):299-329.
- Hadari YR, Arbel-Goren R, Levy Y, Amsterdam A, Alon R, Zakut R, Zick Y. Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J Cell Sci.* 2000;113:2385-97.
- Hafer-Macko C, Pang M, Seilhamer JJ, Baum LG. Galectin-1 is expressed by thymic epithelial cells in myasthenia gravis. *Glycoconj J.* 1996;13(4):591-7.
- Halasz M, Szekeres-Bartho J. The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *J Reprod Immunol.* 2013;97(1):43-50.
- Hanisch FG, Dressen F, Uhlenbruck G. Quantitative Micro-Adhesion Assay on Polystyrene Matrices. U: Gabius, H-J, Gabius, S, editors. *Lectins and Glycobiology*: Springer Berlin Heidelberg; 1993. p. 411-7.
- Hanisch FG, Baldus SE. The Thomsen-Friedenreich (TF) antigen: a critical review on the structural, biosynthetic and histochemical aspects of a pancarcinoma-associated antigen. *Histol Histopathol.* 1997;12(1):263-81.
- Hannan NJ, Paiva P, Dimitriadis E, Salamonsen LA. Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biol Reprod.* 2010;82(2):235-45.

Hanson FW, Powell JE, Stevens VC. Effects of HCG and human pituitary LH on steroid secretion and functional life of the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1971;32(2):211-5.

Henson MC, Babischkin JS, Pepe GJ, Albrecht ED. Effect of the antiestrogen ethamoxytriphetol (MER-25) on placental low density lipoprotein uptake and degradation in baboons. *Endocrinology.* 1988;122(5):2019-26.

Hey NA, Graham RA, Seif MW, Aplin JD. The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78(2):337-42.

Hirabayashi J, Kasai K. Human placenta beta-galactoside-binding lectin. Purification and some properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;122(3):938-44.

Hirabayashi J, Kasai K. Effect of amino acid substitution by sited-directed mutagenesis on the carbohydrate recognition and stability of human 14-kDa beta-galactoside-binding lectin. *J Biol Chem.* 1991;266(35):23648-53.

Hirabayashi J, Kasai K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology.* 1993;3(4):297-304.

Hirabayashi J, Kasai KI. Evolution of animal lectins. *Prog Mol Subcell Biol.* 1998;19:45-88.

Hirota Y, Burnum KE, Acar N, Rabinovich GA, Daikoku T, Dey SK. Galectin-1 markedly reduces the incidence of resorptions in mice missing immunophilin FKBP52. *Endocrinology.* 2012;153(5):2486-93.

Hsu D, Liu F-T. Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconjugate Journal.* 2002;19(7-9):507-15.

Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1473(1):172-85.

Huppertz B, Kertschanska S, Frank HG, Gaus G, Funayama H, Kaufmann P. Extracellular matrix components of the placental extravillous trophoblast: immunocytochemistry and ultrastructural distribution. *Histochem Cell Biol.* 1996;106(3):291-301.

Hutchens TW, Yip T-T. New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 1993;7(7):576-80.

Hutter S, Martin N, von Schonfeldt V, Messner J, Kuhn C, Hofmann S, Andergassen U, Knabl J, Jeschke U. Galectin 2 (gal-2) expression is downregulated on protein and mRNA level in placentas of preeclamptic (PE) patients. *Placenta*. 2015;36(4):438-45.

Inagaki Y, Sohma Y, Horie H, Nozawa R, Kadoya T. Oxidized galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties. *Eur J Biochem*. 2000;267(10):2955-64.

Iwahashi M, Muragaki Y, Ooshima A, Yamoto M, Nakano R. Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium. *J Reprod Fertil*. 1996;108(1):147-55.

Jackson JA, Albrecht ED. The development of placental androstenedione and testosterone production and their utilization by the ovary for aromatization to estrogen during rat pregnancy. *Biol Reprod*. 1985;33(2):451-7.

Janković M. Izolovanje i ispitivanje rastvornog beta galaktozid specifičnog lektina iz humane placente 1989.

Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol*. 2000;157(6):2111-22.

Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW, DeSombre ER. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968;59(2):632-8.

Jeschke U, Reimer T, Bergemann C, Wiest I, Schulze S, Friese K, Walzel H. Binding of galectin-1 (gal-1) on trophoblast cells and inhibition of hormone production of trophoblast tumor cells in vitro by gal-1. *Histochem Cell Biol*. 2004;121(6):501-8.

Jeschke U, Mayr D, Schiessl B, Mylonas I, Schulze S, Kuhn C, Friese K, Walzel H. Expression of galectin-1, -3 (gal-1, gal-3) and the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in normal, IUGR, preeclamptic and HELLP placentas. *Placenta*. 2007;28(11-12):1165-73.

Ji L, Brkic J, Liu M, Fu G, Peng C, Wang YL. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol Aspects Med*. 2013;34(5):981-1023.

Jones CJ, Aplin JD. Glycosylation at the fetomaternal interface: does the glycode play a critical role in implantation? *Glycoconj J*. 2009;26(3):359-66.

Jung EJ, Moon HG, Cho BI, Jeong CY, Joo YT, Lee YJ, Hong SC, Choi SK, Ha WS, Kim JW, Lee CW, Lee JS, Park ST. Galectin-1 expression in cancer-associated stromal

cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. *Int J Cancer*. 2007;120(11):2331-8.

Kadoya T, Horie H. Structural and functional studies of galectin-1: a novel axonal regeneration-promoting activity for oxidized galectin-1. *Curr Drug Targets*. 2005;6(4):375-83.

Kadrofske MM, Openo KP, Wang JL. The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter. *Arch Biochem Biophys*. 1998;349(1):7-20.

Kar M, Ghosh D, Sengupta J. Histochemical and morphological examination of proliferation and apoptosis in human first trimester villous trophoblast. *Hum Reprod*. 2007;22(11):2814-23.

Kasai K, Hirabayashi J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycodes. *J Biochem*. 1996;119(1):1-8.

Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *Embo j*. 1990;9(5):1603-14.

Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod*. 2003;69(1):1-7.

Kemp B, Kertschanska S, Kadyrov M, Rath W, Kaufmann P, Huppertz B. Invasive depth of extravillous trophoblast correlates with cellular phenotype: a comparison of intra- and extrauterine implantation sites. *Histochem Cell Biol*. 2002;117(5):401-14.

King A, Thomas L, Bischof P. Cell culture models of trophoblast II: trophoblast cell lines--a workshop report. *Placenta*. 2000;21 Suppl A:S113-9.

Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell*. 1986;46(7):1053-61.

Kliman HJ, Feinberg RF. Human trophoblast-extracellular matrix (ECM) interactions in vitro: ECM thickness modulates morphology and proteolytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(8):3057-61.

Kliman HJ. Uteroplacental blood flow. The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion. *Am J Pathol*. 2000;157(6):1759-68.

Kliman HJ, Sammar M, Grimpel YI, Lynch SK, Milano KM, Pick E, Bejar J, Arad A, Lee JJ, Meiri H, Gonen R. Placental protein 13 and decidual zones of necrosis: an

immunologic diversion that may be linked to preeclampsia. *Reprod Sci.* 2012;19(1):16-30.

Kolundzic N, Bojic-Trbojevic Z, Kovacevic T, Stefanoska I, Kadoya T, Vicovac L. Galectin-1 is part of human trophoblast invasion machinery--a functional study in vitro. *PLoS One.* 2011a;6(12):e28514.

Kolundzic N, Bojic-Trbojevic Z, Radojic L, Petronijevic M, Vicovac L. Galectin-8 is expressed by villous and extravillous trophoblast of the human placenta. *Placenta.* 2011b;32(11):909-11.

Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med.* 2003;198(8):1201-12.

Kopcow HD, Rosetti F, Leung Y, Allan DS, Kutok JL, Strominger JL. T cell apoptosis at the maternal-fetal interface in early human pregnancy, involvement of galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(47):18472-7.

Kronenberg H, Williams RH. *Williams Textbook of Endocrinology*: Saunders/Elsevier; 2008.

Krozowski Z, MaGuire JA, Stein-Oakley AN, Dowling J, Smith RE, Andrews RK. Immunohistochemical localization of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme in human kidney and placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(7):2203-9.

Kuss E. The fetoplacental unit of primates. *Exp Clin Endocrinol.* 1994;102(3):135-65.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.

Lala PK, Lee BP, Xu G, Chakraborty C. Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002;80(2):142-9.

Le QT, Shi G, Cao H, Nelson DW, Wang Y, Chen EY, Zhao S, Kong C, Richardson D, O'Byrne KJ, Giaccia AJ, Koong AC. Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. *J Clin Oncol.* 2005;23(35):8932-41.

Lee MJ, Wang Z, Yee H, Ma Y, Swenson N, Yang L, Kadner SS, Baergen RN, Logan SK, Garabedian MJ, Guller S. Expression and regulation of glucocorticoid receptor in human placental villous fibroblasts. *Endocrinology.* 2005;146(11):4619-26.

Lee VH, Lee AB, Phillips EB, Roberts JK, Weitlauf HM. Spatio-temporal pattern for expression of galectin-3 in the murine utero-placental complex: evidence for differential regulation. *Biol Reprod.* 1998;58(5):1277-82.

Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J*. 2004;19(7-9):433-40.

Lei CX, Zhang W, Zhou JP, Liu YK. Interactions between galectin-3 and integrin β 3 in regulating endometrial cell proliferation and adhesion. *Hum Reprod*. 2009;24(11):2879-89.

Lessey BA, Ilesanmi AO, Lessey MA, Riben M, Harris JE, Chwalisz K. Luminal and glandular endometrial epithelium express integrins differentially throughout the menstrual cycle: implications for implantation, contraception, and infertility. *Am J Reprod Immunol*. 1996;35(3):195-204.

Levy Y, Arbel-Goren R, Hadari YR, Eshhar S, Ronen D, Elhanany E, Geiger B, Zick Y. Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion. *J Biol Chem*. 2001;276(33):31285-95.

Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galardy R, Damsky CH, Fisher SJ. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol*. 1991;113(2):437-49.

Lin TJ, Billiar RB, Little B. Metabolic clearance of progesterone in the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1972;35(6):879-86.

Liu AX, Jin F, Zhang WW, Zhou TH, Zhou CY, Yao WM, Qian YL, Huang HF. Proteomic analysis on the alteration of protein expression in the placental villous tissue of early pregnancy loss. *Biol Reprod*. 2006;75(3):414-20.

Liu J, Matsuo H, Laoag-Fernandez JB, Xu Q, Maruo T. The effects of progesterone on apoptosis in the human trophoblast-derived HTR-8/SV neo cells. *Mol Hum Reprod*. 2007;13(12):869-74.

Liu ZK, Liu HY, Fang WN, Yang Y, Wang HM, Peng JP. Insulin-like growth factor binding protein 7 modulates estrogen-induced trophoblast proliferation and invasion in HTR-8 and JEG-3 cells. *Cell Biochem Biophys*. 2012;63(1):73-84.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ C(T)} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

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

Lopez-Lucendo MF, Solis D, Andre S, Hirabayashi J, Kasai K, Kaltner H, Gabius HJ, Romero A. Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. *J Mol Biol*. 2004;343(4):957-70.

Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V, Hochberg RB, McKay L, Renoir JM, Weigel NL, Wilson EM, McDonnell DP, Cidlowski JA. International Union of Pharmacology. LXXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):782-97.

Lukyanov P, Furtak V, Ochieng J. Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(2):1031-6.

Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007;5:6.

Lunghi L, Pavan B, Biondi C, Paolillo R, Valerio A, Vesce F, Patella A. Use of glucocorticoids in pregnancy. *Curr Pharm Des.* 2010;16(32):3616-37.

Malassine A, Cronier L. Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine.* 2002;19(1):3-11.

Maldonado CA, Sundblad V, Salatino M, Elia J, Garcia LN, Leimgruber C, Croci DO, Rabinovich GA. Cell-type specific regulation of galectin-3 expression by glucocorticoids in lung Clara cells and macrophages. *Histol Histopathol.* 2011;26(6):747-59.

Mandl M, Ghaffari-Tabrizi N, Haas J, Nohammer G, Desoye G. Differential glucocorticoid effects on proliferation and invasion of human trophoblast cell lines. *Reproduction.* 2006;132(1):159-67.

Maquoi E, van den Brule FA, Castronovo V, Foidart JM. Changes in the distribution pattern of galectin-1 and galectin-3 in human placenta correlates with the differentiation pathways of trophoblasts. *Placenta.* 1997;18(5-6):433-9.

McKinney MM, Parkinson A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J Immunol Methods.* 1987;96(2):271-8.

Menkhorst EM, Gamage T, Cuman C, Kaitu'u-Lino TJ, Tong S, Dimitriadis E. Galectin-7 acts as an adhesion molecule during implantation and increased expression is associated with miscarriage. *Placenta.* 2014;35(3):195-201.

Meseguer M, Pellicer A, Simon C. MUC1 and endometrial receptivity. *Mol Hum Reprod.* 1998;4(12):1089-98.

Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor JE, Martin JC, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod.* 2001;64(2):590-601.

Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev.* 1997;18(3):378-403.

Michael AE, Papageorghiou AT. Potential significance of physiological and pharmacological glucocorticoids in early pregnancy. *Hum Reprod Update.* 2008;14(5):497-517.

Miller WL. Early steps in androgen biosynthesis: from cholesterol to DHEA. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1998;12(1):67-81.

Misao R, Nakanishi Y, Iwagaki S, Fujimoto J, Tamaya T. Expression of progesterone receptor isoforms in corpora lutea of human subjects: correlation with serum oestrogen and progesterone concentrations. *Mol Hum Reprod.* 1998;4(11):1045-52.

Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(8):584-94.

Moiseeva EP, Spring EL, Baron JH, de Bono DP. Galectin 1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix. *J Vasc Res.* 1999;36(1):47-58.

Molvarec A, Blois SM, Stenczer B, Toldi G, Tirado-Gonzalez I, Ito M, Shima T, Yoneda S, Vasarhelyi B, Rigo J, Jr., Saito S. Peripheral blood galectin-1-expressing T and natural killer cells in normal pregnancy and preeclampsia. *Clin Immunol.* 2011;139(1):48-56.

Murphy VE, Clifton VL. Alterations in human placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 with gestational age and labour. *Placenta.* 2003;24(7):739-44.

Murphy VE, Fittock RJ, Zarzycki PK, Delahunty MM, Smith R, Clifton VL. Metabolism of synthetic steroids by the human placenta. *Placenta.* 2007;28(1):39-46.

Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem.* 1974;22(12):1084-91.

Nickel W. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic.* 2005;6(8):607-14.

Nikzad H, Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Iwashita M. Co-expression of galectin-3 and $\alpha\beta 3$ integrin at pinopodes of human endometrium. *Iran J Reprod Med.* 2010;145-52.

Nikzad H, Haddad Kashani H, Kabir-Salmani M, Akimoto Y, Iwashita M. Expression of galectin-8 on human endometrium: Molecular and cellular aspects. *Iran J Reprod Med.* 2013;11(1):65-70.

Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med.* 2001;345(19):1400-8.

Omigbodun A, Ziolkiewicz P, Tessler C, Hoyer JR, Coutifaris C. Progesterone regulates osteopontin expression in human trophoblasts: a model of paracrine control in the placenta? *Endocrinology.* 1997;138(10):4308-15.

Ouyang J, Plutschow A, Pogge von Strandmann E, Reiners KS, Ponader S, Rabinovich GA, Neuberg D, Engert A, Shipp MA. Galectin-1 serum levels reflect tumor burden and adverse clinical features in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2013;121(17):3431-3.

Ozeki Y, Matsui T, Yamamoto Y, Funahashi M, Hamako J, Titani K. Tissue fibronectin is an endogenous ligand for galectin-1. *Glycobiology.* 1995;5(2):255-61.

Palomba S, Russo T, Falbo A, Di Cello A, Amendola G, Mazza R, Tolino A, Zullo F, Tucci L, La Sala GB. Decidual endovascular trophoblast invasion in women with polycystic ovary syndrome: an experimental case-control study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(7):2441-9.

Pei K, Yu C, Shi X, Jia M. The effects of mifepristone on the expressions of osteopontin, interleukin-6 and leukemia inhibitory factor in the villi of early pregnant women. *Contraception.* 2010;82(4):379-84.

Pepe GJ, Albrecht ED. Regulation of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev.* 1990;11(1):151-76.

Pepe GJ, Albrecht ED. Central integrative role of oestrogen in the regulation of placental steroidogenic maturation and the development of the fetal pituitary-adrenocortical axis in the baboon. *Hum Reprod Update.* 1998;4(4):406-19.

Pepe GJ, Albrecht ED. Regulation of functional differentiation of the placental villous syncytiotrophoblast by estrogen during primate pregnancy. *Steroids.* 1999;64(9):624-7.

Phillips B, Knisley K, Weitlauf KD, Dorsett J, Lee V, Weitlauf H. Differential expression of two beta-galactoside-binding lectins in the reproductive tracts of pregnant mice. *Biol Reprod.* 1996;55(3):548-58.

Phillips OP, Elias S, Shulman LP, Andersen RN, Morgan CD, Simpson JL. Maternal serum screening for fetal Down syndrome in women less than 35 years of age using alpha-fetoprotein, hCG, and unconjugated estriol: a prospective 2-year study. *Obstet Gynecol.* 1992;80(3 Pt 1):353-8.

Poirier F, Timmons PM, Chan CT, Guenet JL, Rigby PW. Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development. *Development*. 1992;115(1):143-55.

Poirier F, Robertson EJ. Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. *Development*. 1993;119(4):1229-36.

Poirier F. Roles of galectins in vivo. *Biochem Soc Symp*. 2002(69):95-103.

Pollheimer J, Knofler M. The role of the invasive, placental trophoblast in human pregnancy. *Wien Med Wochenschr*. 2012;162(9-10):187-90.

Popovici RM, Krause MS, Germeyer A, Strowitzki T, von Wolff M. Galectin-9: a new endometrial epithelial marker for the mid- and late-secretory and decidual phases in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(11):6170-6.

Quenby S, Kalumbi C, Bates M, Farquharson R, Vince G. Prednisolone reduces preconceptual endometrial natural killer cells in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril*. 2005;84(4):980-4.

Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(5):338-52.

Rainey WE, Rehman KS, Carr BR. Fetal and maternal adrenals in human pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2004;31(4):817-35.

Ramhorst RE, Giribaldi L, Fraccaroli L, Toscano MA, Stupirski JC, Romero MD, Durand ES, Rubinstein N, Blaschitz A, Sedlmayr P, Genti-Raimondi S, Fainboim L, Rabinovich GA. Galectin-1 confers immune privilege to human trophoblast: implications in recurrent fetal loss. *Glycobiology*. 2012;22(10):1374-86.

Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest*. 2004;114(6):744-54.

Rheaume E, Simard J, Morel Y, Mebarki F, Zachmann M, Forest MG, New MI, Labrie F. Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Nat Genet*. 1992;1(4):239-45.

Ringler GE, Kallen CB, Strauss JF, 3rd. Regulation of human trophoblast function by glucocorticoids: dexamethasone promotes increased secretion of chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 1989;124(4):1625-31.

Rossmannith WG, Wolfahrt S, Ecker A, Eberhardt E. The demonstration of progesterone, but not of estrogen, receptors in the developing human placenta. *Horm Metab Res.* 1997;29(12):604-10.

Ryan KJ. Biological aromatization of steroids. *J Biol Chem.* 1959;234(2):268-72.

Ryu JS, Majeska RJ, Ma Y, LaChapelle L, Guller S. Steroid regulation of human placental integrins: suppression of alpha2 integrin expression in cytotrophoblasts by glucocorticoids. *Endocrinology.* 1999;140(9):3904-8.

Sahab ZJ, Man YG, Semaan SM, Newcomer RG, Byers SW, Sang QX. Alteration in protein expression in estrogen receptor alpha-negative human breast cancer tissues indicates a malignant and metastatic phenotype. *Clin Exp Metastasis.* 2010;27(7):493-503.

Saif Z, Hodyl NA, Hobbs E, Tuck AR, Butler MS, Osei-Kumah A, Clifton VL. The human placenta expresses multiple glucocorticoid receptor isoforms that are altered by fetal sex, growth restriction and maternal asthma. *Placenta.* 2014;35(4):260-8.

Salomonsson E, Larumbe A, Tejler J, Tullberg E, Rydberg H, Sundin A, Khabut A, Frejd T, Lobsanov YD, Rini JM, Nilsson UJ, Leffler H. Monovalent interactions of galectin-1. *Biochemistry.* 2010;49(44):9518-32.

Salvatore P, Contursi C, Benvenuto G, Bruni CB, Chiariotti L. Characterization and functional dissection of the galectin-1 gene promoter. *FEBS Lett.* 1995;373(2):159-63.

Sanderson JT. Placental and fetal steroidogenesis. *Methods Mol Biol.* 2009;550:127-36.

Sanford GL, Owens MA, Odusanya BM. Differential influence of dexamethasone on the activity and synthesis of beta-galactoside specific lectin (galaptin) during postnatal lung development. *Exp Lung Res.* 1993;19(1):91-104.

Satelli A, Rao PS, Gupta PK, Lockman PR, Srivenugopal KS, Rao US. Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines. *Oncol Rep.* 2008;19(3):587-94.

Sato S, Burdett I, Hughes RC. Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Exp Cell Res.* 1993;207(1):8-18.

Saussez S, Glinoyer D, Chantrain G, Pattou F, Carnaille B, Andre S, Gabius HJ, Laurent G. Serum galectin-1 and galectin-3 levels in benign and malignant nodular thyroid disease. *Thyroid.* 2008;18(7):705-12.

Schneider H. Placental oxygen consumption. Part II: in vitro studies--a review. *Placenta.* 2000;21 Suppl A:S38-44.

Schwanhausser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 2011;473(7347):337-42.

Scott R, Navot D, Liu HC, Rosenwaks Z. A human in vivo model for the luteoplacental shift. *Fertil Steril*. 1991;56(3):481-4.

Seelenmeyer C, Wegehingel S, Tews I, Kunzler M, Aebi M, Nickel W. Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1. *J Cell Biol*. 2005;171(2):373-81.

Shimonovitz S, Hurwitz A, Hochner-Celnikier D, Dushnik M, Anteby E, Yagel S. Expression of gelatinase B by trophoblast cells: down-regulation by progesterone. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;178(3):457-61.

Siristatidis C, Chrelias C, Creatsa M, Varounis C, Vrachnis N, Iliodromiti Z, Kassanos D. Addition of prednisolone and heparin in patients with failed IVF/ICSI cycles: a preliminary report of a clinical trial. *Hum Fertil (Camb)*. 2013;16(3):207-10.

Staun-Ram E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:56.

Steinbuch M, Audran R. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch Biochem Biophys*. 1969;134(2):279-84.

Stowell SR, Arthur CM, Mehta P, Slanina KA, Blixt O, Leffler H, Smith DF, Cummings RD. Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. *J Biol Chem*. 2008;283(15):10109-23.

Strauss JF, 3rd, Martinez F, Kiriakidou M. Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. *Biol Reprod*. 1996;54(2):303-11.

Surveyor GA, Gendler SJ, Pemberton L, Das SK, Chakraborty I, Julian J, Pimental RA, Wegner CC, Dey SK, Carson DD. Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology*. 1995;136(8):3639-47.

Tarrade A, Goffin F, Munaut C, Lai-Kuen R, Tricottet V, Foidart JM, Vidaud M, Frankenne F, Evain-Brion D. Effect of matrigel on human extravillous trophoblasts differentiation: modulation of protease pattern gene expression. *Biol Reprod*. 2002;67(5):1628-37.

Than NG, Sumegi B, Than GN, Berente Z, Bohn H. Isolation and sequence analysis of a cDNA encoding human placental tissue protein 13 (PP13), a new lysophospholipase, homologue of human eosinophil Charcot-Leyden Crystal protein. *Placenta*. 1999;20(8):703-10.

Than NG, Erez O, Wildman DE, Tarca AL, Edwin SS, Abbas A, Hotra J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan SS, Espinoza J, Papp Z, Romero R. Severe preeclampsia is characterized by increased placental expression of galectin-1. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008a;21(7):429-42.

Than NG, Kim SS, Abbas A, Han YM, Hotra J, Tarca AL, Erez O, Wildman DE, Kusanovic JP, Pineles B, Montenegro D, Edwin SS, Mazaki-Tovi S, Gotsch F, Espinoza J, Hassan SS, Papp Z, Romero R. Chorioamnionitis and increased galectin-1 expression in PPRM --an anti-inflammatory response in the fetal membranes? *Am J Reprod Immunol.* 2008b;60(4):298-311.

Than NG, Romero R, Erez O, Weckle A, Tarca AL, Hotra J, Abbas A, Han YM, Kim SS, Kusanovic JP, Gotsch F, Hou Z, Santolaya-Forgas J, Benirschke K, Papp Z, Grossman LI, Goodman M, Wildman DE. Emergence of hormonal and redox regulation of galectin-1 in placental mammals: implication in maternal-fetal immune tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008c;105(41):15819-24.

Than NG, Romero R, Goodman M, Weckle A, Xing J, Dong Z, Xu Y, Tarquini F, Szilagyi A, Gal P, Hou Z, Tarca AL, Kim CJ, Kim JS, Haidarian S, Uddin M, Bohn H, Benirschke K, Santolaya-Forgas J, Grossman LI, Erez O, Hassan SS, Zavodszky P, Papp Z, Wildman DE. A primate subfamily of galectins expressed at the maternal-fetal interface that promote immune cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(24):9731-6.

Than NG, Romero R, Kim CJ, McGowen MR, Papp Z, Wildman DE. Galectins: guardians of eutherian pregnancy at the maternal-fetal interface. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(1):23-31.

Than NG, Romero R, Xu Y, Erez O, Xu Z, Bhatti G, Leavitt R, Chung TH, El-Azzamy H, LaJeunesse C, Wang B, Balogh A, Szalai G, Land S, Dong Z, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Krispin M, Kim CJ, Tarca AL, Papp Z, Bohn H. Evolutionary origins of the placental expression of chromosome 19 cluster galectins and their complex dysregulation in preeclampsia. *Placenta.* 2014;35(11):855-65.

Thijssen VL, Hulsmans S, Griffioen AW. The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol.* 2008;172(2):545-53.

Tirado-Gonzalez I, Freitag N, Barrientos G, Shaikly V, Nagaeva O, Strand M, Kjellberg L, Klapp BF, Mincheva-Nilsson L, Cohen M, Blois SM. Galectin-1 influences trophoblast immune evasion and emerges as a predictive factor for the outcome of pregnancy. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(1):43-53.

Tuckey RC. Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta.* 2005;26(4):273-81.

Tulchinsky D, Hobel CJ, Yeager E, Marshall JR. Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. I. Normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1972;112(8):1095-100.

Uzelac PS, Li X, Lin J, Neese LD, Lin L, Nakajima ST, Bohler H, Lei Z. Dysregulation of leptin and testosterone production and their receptor expression in the human placenta with gestational diabetes mellitus. *Placenta.* 2010;31(7):581-8.

van Beek JP, Guan H, Julan L, Yang K. Glucocorticoids stimulate the expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in cultured human placental trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(11):5614-21.

van den Brule F, Berndt S, Simon N, Coulon C, Le Goarant J, Munaut C, Noel A, Frankenne F, Foidart JM. Trophoblast invasion and placentation: molecular mechanisms and regulation. *Chem Immunol Allergy.* 2005;88:163-80.

van den Brule FA, Price J, Sobel ME, Lambotte R, Castronovo V. Inverse expression of two laminin binding proteins, 67LR and galectin-3, correlates with the invasive phenotype of trophoblastic tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;201(1):388-93.

van Leusden H, Vिलее CA. The de novo synthesis of sterols and steroids from acetate by preparations of human term placenta. *Steroids.* 1965;6(1):31-45.

Varagić V, Milošević M. *Farmakologija.* 17. izdanje ed: Elit Medica; 2002.

Vicovac L, Aplin JD. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta Anat (Basel).* 1996;156(3):202-16.

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;16(1):41-56.

Vićovac L, Jankovic M, Cuperlovic M. Galectin-1 and -3 in cells of the first trimester placental bed. *Hum Reprod.* 1998;13(3):730-5.

von Wolff M, Wang X, Gabius HJ, Strowitzki T. Galectin fingerprinting in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and in early gestation. *Mol Hum Reprod.* 2005;11(3):189-94.

Wang W, Li J, Ge Y, Li W, Shu Q, Guan H, Yang K, Myatt L, Sun K. Cortisol induces aromatase expression in human placental syncytiotrophoblasts through the cAMP/Sp1 pathway. *Endocrinology.* 2012;153(4):2012-22.

-
- Watanabe M, Takemasa I, Kaneko N, Yokoyama Y, Matsuo E, Iwasa S, Mori M, Matsuura N, Monden M, Nishimura O. Clinical significance of circulating galectins as colorectal cancer markers. *Oncol Rep.* 2011;25(5):1217-26.
- Welboren WJ, Stunnenberg HG, Sweep FC, Span PN. Identifying estrogen receptor target genes. *Mol Oncol.* 2007;1(2):138-43.
- Welton JL, Khanna S, Giles PJ, Brennan P, Brewis IA, Staffurth J, Mason MD, Clayton A. Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Mol Cell Proteomics.* 2010;9(6):1324-38.
- Yanaba K, Asano Y, Akamata K, Noda S, Aozasa N, Taniguchi T, Takahashi T, Toyama T, Ichimura Y, Sumida H, Kuwano Y, Miyazaki M, Sato S. Circulating galectin-1 concentrations in systemic sclerosis: potential contribution to digital vasculopathy. *Int J Rheum Dis.* 2014.
- Yang H, Taylor HS, Lei C, Cheng C, Zhang W. Hormonal regulation of galectin 3 in trophoblasts and its effects on endometrium. *Reprod Sci.* 2011;18(11):1118-27.
- Yang H, Lei C, Zhang W. Expression of galectin-3 in mouse endometrium and its effect during embryo implantation. *Reprod Biomed Online.* 2012;24(1):116-22.
- Yoon DY, Ma Y, Krikun G, Lockwood CJ, LaChapelle L, Guller S. Glucocorticoid effects in the human placenta: evidence that dexamethasone-mediated inhibition of fibronectin expression in cytotrophoblasts involves a protein intermediate. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(2):632-7.
- Zhou Q, Cummings RD. The S-type lectin from calf heart tissue binds selectively to the carbohydrate chains of laminin. *Arch Biochem Biophys.* 1990;281(1):27-35.
- Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest.* 1997;99(9):2139-51.
- Zhu Q, Wu L, Xu B, Hu MH, Tong XH, Ji JJ, Liu YS. A retrospective study on IVF/ICSI outcome in patients with anti-nuclear antibodies: the effects of prednisone plus low-dose aspirin adjuvant treatment. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013;11:98.

Prilozi

Radovi proistekli iz doktorske disertacije:

Ćujić D, Bojić-Trbojević Ž, Tošić N, Pavlović S. i Vićovac Lj. Effect of steroids on transcription and secretion of Gal-1 by the human trophoblast cell line in vitro. Arch Biol Sci. 2013. 65(4): 1331-1337.

Ćujić D, Bojić-Trbojević Ž, Kolundžić N, Kadoya T i Vićovac Lj. Molecular forms of galectin-1 from human placenta and trophoblast cells. J Serb Chem Soc. 2015. 80(2): 159-169.

Biografija

Danica Ćujić rođena je 04.05.1979. godine u Zemunu. Diplomirala je na Farmaceutskom fakultetu, smer diplomirani farmaceut-medicinski biohemičar, 2004. godine sa prosečnom ocenom 9,16. Stručni ispit položila je 27.12.2005. godine. Doktorske studije iz Medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2007/2008 godine.

U Institutu za primenu nuklearne energije – INEP zaposlena je od februara 2007. godine. U zvanje istraživač saradnik izabrana je u julu 2010. godine. Do sada je učestvovala u dva nacionalna projekta „Ćelijske interakcije i molekularni mehanizmi u diferencijaciji ćelija u implantaciji embriona i placentaciji“ i „Trofoblast i ekstraembrionalne fetalne ćelije: plastičnost, faktori diferencijacije i *in vitro* modulacija funkcionalnih svojstava“ i međunarodnom projektu u okviru FP6 programa EU "Health Improvement in Serbia through Reinforcement of Biomedical Science and Technology". U okviru svog istraživačkog rada bavi se reproduktivnom biologijom, sa akcentom na praćenje uticaja steroidnih hormona na funkciju trofoblasta. Eksperimentalni deo doktorske teze uradila je na Odeljenju za biologiju reprodukcije Instituta za primenu nuklearne energije – INEP pod rukovodstvom dr Žanke Bojić-Trbojević, naučnog saradnika INEP-a i dr Ljiljane Vićovac Panić, naučnog savetnika INEP-a.

Pored naučno-istraživačkog rada, uključena je i aktivnosti INEP-a vezane za razvoj i primenu imunohemijskih metoda, kontrolu kvaliteta i laboratorijsku dijagnostiku. Kao učesnik Festivala nauke i Noći istraživača učestvuje u promociji i popularizaciji nauke.

Član je Komore biohemičara Srbije, Biohemijskog društva Srbije, Srpskog udruženja za proteomiku i Društva endokrinologa (Endocrine Society).

Do sada je objavila 6 radova u međunarodnim časopisima, jedno poglavlje u monografiji i više saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima.

Прилог 3.

Изјава о ауторству

Потписана Даница Р. Ђујић

број индекса 3/07

Изјављујем

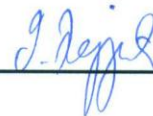
да је докторска дисертација под насловом

Утицај стероидних хормона и њихових антагониста на нивое галектина у ћелијама
трофобласта човека *in vitro*

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

Потпис докторанда

У Београду, 29.06.2015.



Прилог 4.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Даница Р. Ћујић

Број индекса 3/07

Студијски програм Медицинска биохемија

Наслов рада Утицај стероидних хормона и њихових антагониста на нивое галектина у ћелијама трофобласта човека *in vitro*

Ментори

Др Славица Спасић, професор емеритус Фармацеутског факултета
Универзитета у Београду

Др Жанка Бојић-Трбојевић, научни сарадник Института за примену
нуклеарне енергије Универзитета у Београду

Потписана Даница Р. Ћујић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла 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, 29.06.2015.



Прилог 5.

Изјава о коришћењу

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

Утицај стероидних хормона и њихових антагониста на нивое галектина у ћелијама трофобласта човека *in vitro*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предла 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 доктора

У Београду, 29.06.2015.



1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.