

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Pavo Perković

EKSPRESIJA PATCHED 1, SMOOTHENED, CRIPTO-1 I  
SURVIVIN PROTEINA U POSTELJICAMA SA ZASTOJEM  
FETALNOG RASTA

Doktorski rad

Rijeka, 2025.



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Pavo Perković

EKSPRESIJA PATCHED 1, SMOOTHENED, CRIPTO-1 I  
SURVIVIN PROTEINA U POSTELJICAMA SA ZASTOJEM  
FETALNOG RASTA

Doktorski rad

Mentorica rada: Prof. dr. sc. Tea Štimac, dr. med.  
Komentorica rada: Doc. dr. sc. Andrea Dekanić, dr. med.

Rijeka, 2025.



UNIVERSITY OF RIJEKA  
FACULTY OF MEDICINE

Pavo Perković

PATCHED 1, SMOOTHENED, CRIPTO-1 AND SURVIVIN  
PROTEIN EXPRESSION IN PLACENTAS WITH FETAL  
GROWTH RESTRICTION

Doctoral dissertation

Mentor: Prof. Tea Štimac, PhD  
Co-Mentor: Doc. Andrea Dekanić, PhD

Rijeka, 2025.



Mentorica rada: prof. dr.sc. Tea Štimac, dr.med

Komentorica rada: doc. dr. sc. Andrea Dekanić, dr. med.

Doktorski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_(titula, ime i prezime)
2. \_\_\_\_\_(titula, ime i prezime)
3. \_\_\_\_\_(titula, ime i prezime)
4. \_\_\_\_\_(titula, ime i prezime)
5. \_\_\_\_\_(titula, ime i prezime)

Rad ima \_\_\_\_\_listova.

UDK: \_\_\_\_\_

## SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** intrauterini zastoje rasta (IUGR) je patološko stanje definirano smanjenom sposobnošću fetusa da postigne genetski očekivani potencijal rasta tijekom trudnoće. Tijekom početnih faza placentacije dolazi do složenih međusobno povezanih procesa kao što su proliferacija stanica, diferencijacija, apoptoza i invazija trofoblasta. Diferencijacija stanica trofoblasta uključuje proces epitelno-mezenhimne tranzicije (EMT) u kojoj važnu ulogu igraju proteini Hedgehog signalnog puta. Ptch1 protein je inhibitor Hh signalnog puta dok Smo pokreće kaskadnu aktivaciju ovog puta. Cripto-1 ima ulogu u indukciji EMT, a survivin u regulaciji stanične diobe i inhibiciji apoptoze. Cilj ovog istraživanja je bio ispitati ekspresiju proteina Ptch1, Smo, cripto-1 i survivina u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i u terminskim posteljicama iz zdravih trudnoća kako bi se istražio njihov potencijal kao biomarkera za ranu dijagnozu, prevenciju i liječenje intrauterinog zastoja rasta.

**Metode:** prisutnost proteina Ptch1, Smo, cripto-1 i survivina određena je u 153 arhivirane posteljice od kojih su 122 posteljice iz IUGR-a i 31 iz nekomplikiranih terminskih trudnoća. Proteini su kvantificirani imunohistokemijski i izraženi u vidu postotka pozitivnih stanica (PPS) i intenziteta reakcije (IR). Skupine su formirane prema vrijednostima imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) koji čini umnožak PPS i IR.

**Rezultati:** istraživanje je pokazalo pojačanu ekspresiju Ptch1 i survivina u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na kontrolnu skupinu. Nije bilo razlike u ekspresiji Smo i cripto-1 između ove dvije skupine. Rezultati pokazuju da je u IUGR posteljicama značajnije inhibiran prijenos Hh signalnim putem koji može za posljedicu imati slabiju epitelno-mezenhimnu tranziciju ekstraviloznog trofoblasta kao važnog čimbenika patologije trudnoće.

**Zaključak:** poremećaji Hh signalnog puta utječu na funkcionalne i morfološke promjene u posteljičnom tkivu dovodeći do zastoja fetalnog rasta. Povećana ekspresija Ptch1 i survivina u posteljicama s IUGR-om ukazuje na njihovu potencijalnu ulogu kao pokazatelja disfunkcije posteljice a koji bi se u budućnosti mogli koristiti u dijagnostici i ciljanoj terapiji zastoja fetalnog rasta.

**Ključne riječi:** cripto-1; intrauterini zastoje rasta; posteljica; Ptch1; Smo; survivin



## SUMMARY

**Objective:** intrauterine growth restriction (IUGR) is a pathological condition defined as the reduced ability of the fetus to achieve its genetically predetermined growth potential during pregnancy. In the early stages of placentation, complex and interrelated processes occur, including cell proliferation, differentiation, apoptosis, and trophoblast invasion. Trophoblast differentiation involves the process of epithelial–mesenchymal transition (EMT), in which proteins of the Hedgehog (Hh) signaling pathway play a critical role. The Ptch1 protein acts as an inhibitor of the Hh pathway, whereas Smo initiates its cascade activation. Cripto-1 contributes to EMT induction, while survivin regulates cell division and inhibits apoptosis. The aim of this study was to examine the expression of Ptch1, Smo, Cripto-1, and survivin in placentas from pregnancies complicated by IUGR and in term placentas from healthy pregnancies, in order to evaluate their potential as biomarkers for early diagnosis, prevention, and treatment of intrauterine growth restriction.

**Methods:** the presence of Ptch1, Smo, cripto-1, and survivin proteins was determined in 153 archived placentas, of which 122 were from IUGR pregnancies and 31 from uncomplicated term pregnancies. Proteins were quantified immunohistochemically and expressed as the percentage of positive cells (PPC) and reaction intensity (RI). Groups were stratified according to the values of the immunohistochemical staining index (ISI), calculated as the product of PPC and RI.

**Results:** the study demonstrated increased expression of Ptch1 and survivin in placentas from IUGR pregnancies compared with the control group. No differences in the expression of Smo and cripto-1 were observed between the groups. The findings indicate that in IUGR placentas, Hh pathway signaling is more strongly inhibited, which may result in impaired epithelial–mesenchymal transition of extravillous trophoblasts, an important factor in pregnancy pathology.

**Conclusion:** dysregulation of the Hh signaling pathway influences functional and morphological changes in placental tissue, leading to fetal growth restriction. The increased expression of Ptch1 and survivin in IUGR placentas suggests their potential role as markers of placental dysfunction, which could be utilized in the future for diagnostic purposes and possibly for targeted therapies of intrauterine growth restriction.

**Keywords:** cripto-1; intrauterine growth restriction; placenta; Ptch1; Smo; survivin

## SADRŽAJ

|                                                                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. UVOD I PREGLED ISTRAŽIVANJA                                                                                                                                            | 1   |
| 1.1 Posteljica                                                                                                                                                            | 1   |
| 1.2 Epitelno-mezenhimalna tranzicija                                                                                                                                      | 1   |
| 1.3 Hedgehog signalni put                                                                                                                                                 | 3   |
| 1.3.1 Protein Ptch1                                                                                                                                                       | 5   |
| 1.3.2 Protein Smoothened                                                                                                                                                  | 6   |
| 1.3.3 Protein cripto-1                                                                                                                                                    | 6   |
| 1.3.4 Protein survivin                                                                                                                                                    | 7   |
| 1.4 Intrauterini zastoj fetalnog rasta                                                                                                                                    | 8   |
| 1.4.1 Podjela intrauterinog zastoja fetalnog rasta                                                                                                                        | 10  |
| 1.4.2 Patohistološke promjene na posteljicama iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta                                                                           | 11  |
| 1.4.3 Dijagnostika intrauterinog zastoja fetalnog rasta                                                                                                                   | 12  |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA                                                                                                                                                      | 14  |
| 3. MATERIJALI I METODE                                                                                                                                                    | 15  |
| 3.1 Materijali                                                                                                                                                            | 15  |
| 3.2 Metode                                                                                                                                                                | 15  |
| 3.2.1 Patomorfološka analiza posteljice                                                                                                                                   | 15  |
| 3.2.2 Imunohistokemijska metoda detekcije ekspresije biljega u posteljici                                                                                                 | 16  |
| 3.2.3 Kvantifikacija ekspresije Ptch1, Smo, cripto-1 i survivina                                                                                                          | 17  |
| 3.3 Statistička obrada podataka                                                                                                                                           | 18  |
| 4. REZULTATI                                                                                                                                                              | 19  |
| 4.1 Ekspresija proteina Ptch1 u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolama                                                                                      | 23  |
| 4.2 Ekspresija proteina Smo u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolama                                                                                        | 29  |
| 4.3 Ekspresija proteina survivin u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolama                                                                                   | 34  |
| 4.4 Ekspresija proteina cripto-1 u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolama                                                                                   | 38  |
| 4.5 Ekspresija proteina Ptch1, Smo, survivina i cripto-1 u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom                                                       | 44  |
| 4.6 Ekspresija proteina Ptch1, Smo, survivina i cripto-1 u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i patološkim nalazom Dopplera                                          | 65  |
| 4.7 Imunohistokemijska analiza ekspresije proteina Ptch1, Smo, survivina, cripto-1 i morfološke promjene u posteljicama iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta | 87  |
| 5. RASPRAVA                                                                                                                                                               | 97  |
| 5.1 Ekspresija proteina Ptch1                                                                                                                                             | 99  |
| 5.2 Ekspresija proteina Smo                                                                                                                                               | 100 |

|                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.3 Ekspresija proteina survivina _____                                                                                    | 101 |
| 5.4 Ekspresija proteina cripto-1 _____                                                                                     | 102 |
| 5.5 Ekspresija proteina i preeklampsija _____                                                                              | 104 |
| 5.6 Ekspresija proteina i patološki nalaz fetalnog Dopplera _____                                                          | 105 |
| 5.7 Ekspresija proteina u odnosu na morfološke promjene posteljica iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta _____ | 107 |
| 6. ZAKLJUČAK _____                                                                                                         | 109 |
| 7. LITERATURA _____                                                                                                        | 110 |
| 8. ILUSTRACIJE _____                                                                                                       | 120 |
| 9. POPIS OZNAKA I KRATICA _____                                                                                            | 130 |
| 10. ŽIVOTOPIS _____                                                                                                        | 132 |



# 1. UVOD I PREGLED ISTRAŽIVANJA

## 1.1 Posteljica

Posteljica je organ koji čini vaskularnu vezu između majke i fetusa čime omogućuje razmjenu hranjivih tvari i plinova između njihovih krvotoka. Posteljica štiti fetus od imunološkog sustava majke i stvara hormone pa ima ulogu endokrinog organa [1].

Osnovna uloga posteljice je uspostavljanje krvotoka između majke i fetusa te predstavlja prvi organ koji se stvara u trudnoći [2]. Poremećaji rasta, fetalne anomalije, smrt ploda ili bolesti majke vezane za trudnoću najčešće su posljedica poremećaja u razvoju vaskularnog sustava posteljice [3].

Posteljica je građena od parenhima, decidualnog tkiva s majčine strane (*lat. decidua basalis*) te membrana amniona i koriona. Krvne žile majke u posteljici umjesto endotelnih stanica obložene su stanicama ekstraviloznog trofoblasta i otvaraju se u intervilozne prostore.

Fetalni dio posteljice čini korionska ploča građena od korionskih resice unutar kojih se nalaze krvne žile fetusa. Korionske resice su prekrivene trofoblastom (vilozni trofoblast) koji se sastoji od unutarnjeg sloja citotrofoblasta i vanjskog sloja sinciotrofoblasta.

Endotel fetalnih kapilara u korionskim resicama je u indirektnom kontaktu s majčinom krvlju preko trofoblasta koji čine barijeru između fetalnog i majčinog krvotoka te je prema tome ljudska posteljica hemokorijalna [4, 5].

## 1.2 Epitelno-mezenhimalna tranzicija

Za normalnu funkciju posteljice važna je diferencijacija humanog placentarnog citotrofoblasta (CTB) u invazivni ekstravilozni citotrofoblast (EVT) tj. stanični prijelaz iz epitelnog fenotipa u mezenhimski. Epitelne stanice se diferenciraju u mezenhimske stanice procesom koji se naziva epitelno-mezenhimalna tranzicija (*engl. epithelial-mesenchymal transition; EMT*). EMT je povratni proces koji uključuje i mezenhimalno-epitelni prijelaz (mezenhimalno-epitelna tranzicija; MET) kojim se transformirane mezenhimske stanice opet mogu vratiti u epitelne. MET se prvi put pojavljuje tijekom razvoja u periodu predimplantacije, a EMT tijekom procesa stvaranja mezoderma [6, 7].

EMT se odvija pod kontrolom niza molekularnih procesa koji za sada nisu dovoljno poznati. U tom procesu epitelne stanice počinju nalikovati fibroblastima – dobivaju sposobnost migracije

i invazije. Ekstravilozni citotrofoblast procesima invazije i migracije infiltrira majčine krvne žile i deciduu. Na taj način endotelne stanice krvnih žila zamjenjuju se stanicama trofoblasta, nestaje glatki mišić medije, a spiralne arteriole majke pretvaraju se u široke kanale niskog otpora čime se povećava protok krvi kroz posteljicu. Taj proces naziva se arterijsko remodeliranje ili fiziološka pretvorba spiralnih arterija i važan je mehanizam i za nastanak EMT [8, 9, 10, 11].

Tijekom EMT dolazi do gubitka polariteta epitelnih stanica, reorganiziranja citoskeletne arhitekture i promjene oblika stanice, ekspresije gena koji potiču mezenhimalni fenotip i povećanja pokretljivosti stanica. Razgradnja proteina izvanstaničnog matriksa (ekstracelularni matriks, ECM) pomoću matriks metaloproteinaze doprinosi invazivnom ponašanju stanica.

EMT se odvija tijekom placentacije ali i u raznim fazama embrionalnog razvoja. EMT potiču niz transkripcijskih faktora koji reguliraju ekspresiju kadherina prije svega E-kadherina čime moduliraju adheziju stanica [12].

U regulaciji EMT sudjeluju signalni putevi koji su međusobno povezani u mreži međusobnih interakcija kako bi potaknuli EMT. Osim pokretanja EMT putem SMAD proteina, transformirajući faktor rasta  $\beta$  (*engl. transforming growth factor beta, TGF $\beta$* ) aktivira puteve PI3K-AKT, ERK MAPK, p38 MAPK i Jun N-terminalnu kinazu. Nekoliko faktora rasta koji djeluju putem receptorskih tirozin kinaza (RTK) uključujući epidermalni faktor rasta (*engl. epidermal growth factor, EGF*), faktor rasta fibroblasta (*engl. fibroblast growth factor, FGF*), faktor rasta hepatocita (*engl. hepatocyte growth factor, HGF*), vaskularni endotelni faktor rasta (*engl. vascular endothelial growth factor, VEGF*) mogu inducirati EMT.

U EMT-u sudjeluju brojni signalni putevi kao Wnt, Notch i Hedgehog (Hh). U Hh signalnom putu Gli1 inducira ekspresiju Snail1 te tako potiče smanjenje razine epitelnog kadherina (E-kadherin) dok survivin povećava ekspresiju E-kadherina u procesu EMT [13]. Cripto-1 je povezan s EGF i EMT a njegova smanjena ekspresija je povezana s poremećajima u stvaranju mezoderma [14, 15].

Smatra se da je nedostatna invazija trofoblasta povezana s razvojem kronične placentalne insuficijencije, a preduboka invazija s razvojem koriokarcinoma [16, 17]. Budući da se radi o invaziji i migraciji stanica ovaj proces je poznat u invaziji karcinomskih stanica i stvaranju metastaza [18].

### 1.3 Hedgehog signalni put

Hedgehog signalni put (Hh) se prvi put opisuje kod vinske mušice (*lat. Drosophila melanogaster*) kada je detektirana genska mutacija u uzorku ličinke nalik bodljikavom ježu po čemu je put dobio ime [19]. To je ujedno i evolucijski sačuvan put prijenosa signala od stanične membrane do jezgre.

Hh signalni put sudjeluje u diferencijaciji i proliferaciji stanica u normalnom embrionalnom razvoju kao i nastanku tumora u ljudi. Embriogeneza i tumorigeneza imaju zajedničke karakteristike, a oba procesa ovise o koordinaciji proliferacije, diferencijacije i migracije [20].

Sastavnice Hh signalnog puta su: transmembranski protein Ptch1 (*engl. Protein patched homolog 1*) koji služi kao receptor ovog puta te tri posrednika Hh signalizacije Gli1, Gli2 i Gli3. Gli1 je aktivator, a Gli2 i Gli3 mogu biti aktivatori ili represori ove signalizacije. Aktivacijom Hh signalnog puta Gli protein se translocira u jezgru i dovodi do transkripcije ciljnih gena vezivanjem za njihove promotore.

Protein Smoothed (Smo) koji je povezan s Gli proteinima regulira aktivaciju Hh signalnog puta. U slučaju nedostatka liganda Sonic Hedgehog (Shh) Smo inhibira Ptch1 i put je inaktivan.

Hh signalni put aktiviraju tri člana obitelji Hh gena: Sonic Hedgehog (Shh), Indiana Hedgehog (Ihh) i Desert Hedgehog (Dhh). Bilo koji od ova tri gena se mogu vezati za Ptch1 i pokrenuti Hh signalizaciju [21, 22].

Shh je najjači aktivator Hh signalnog puta i ima važnu ulogu u razvoju ploda uključujući zatvaranje neuralne cijevi, razvoju udova, zuba, gušterače, pluća i folikula dlake [23]. Taj put je složen jer se ne kontroliraju samo komponente tog puta nego i posttranslacijske modifikacije među kojima su ubikvitinacija i acetilacija [24].

Shh se veže na transmembranski protein Ptch1 na površini stanice. U nedostatku Shh, Ptch1 potiskuje aktivnost receptora Smo. Vezanje Shh na Ptch1 smanjuje inhibiciju Smo što dovodi do aktivacije Gli transkripcijskih faktora. Transkripcijski faktori Gli1 i Gli2 cijepaju se i transportiraju u jezgru što dovodi do transkripcije Gli ciljnih gena uključujući Ptch1 i Gli [25]. U slučaju inhibicije Shh signalizacije zaustavlja se diferencijacija neuralne ploče [26]. Prekomjerna aktivacija Shh povezana je s brojnim vrstama raka, posebice karcinomom bazalnih stanica i meduloblastomom.

Sufu protein je negativan regulator Hh signalnog puta. Sufu se veže izravno za Gli proteine, a aktivirani Smo dovodi do pomaka Sufu-Gli kompleksa u cilije nakon čega slijedi disocijacija kompleksa i započinje transkripcija ciljnog gena [27, 28]. Sufu inhibira Gli proteine sprečavajući njihovu translokaciju u jezgru, odnosno ima važnu ulogu u stabilizaciji Gli i održavanju točnosti Hh signalizacije [29, 30].

Postoje dva osnovna Hh signalna puta: kanonski i nekanonski signalni put. Aktivacija kanonskog puta ide preko receptora Ptch1 i Gli transkripcijskih faktora, a nekanonskog puta niže od Smo proteina odnosno neovisno o Smo proteinu. Kanonski Shh put reguliran je trajanjem signala kao i izmjenom ravnoteže aktivatora Gli A i represora Gli R. Od Gli faktora transkripcije (Gli1, Gli2 i Gli3) Gli3 ima ulogu represora, a Gli1 i Gli2 uloge aktivatora. Aktivan Smo potiče razgradnju, proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu u različitim stanicama i organima [31]. Hh svoju ulogu ostvaruje snagom represora Gli R i aktivatora Gli A [32].

U slučaju nedostatka Hh liganda protein kinaza A (PKA) inhibira aktivnost transkripcijskih faktora Gli dok se u prustnosti liganda aktivira Ptch1 koji omogućava Smo da se aktivira i poništi inhibicijski učinak PKA na Gli proteine, a Gli2 i Gli3 postaju aktivatori [33]. Aktivnost PKA je ključna za Hh signalizaciju. Bazalna razina aktivnosti PKA u odsutnosti Hh liganda održava supresiju Hh signalnog puta. Ako je aktivnost PKA smanjena to uzrokuje ektopičnu ekspresiju Hh ciljnih gena [34].

Steroidni hormoni imaju važnu ulogu u fiziološkim procesima u stanici. Progesteron se sintetizira u trudnoći, a posteljica je steroidogeno tkivo. Progesteron potiče Ihh za koji je poznato da je bitan u komunikaciji epitela i strome u implantaciji embrija. Poremećaji u tom putu mogu dovesti do neplodnosti ili odbacivanja ploda [35].

Na staničnoj liniji dokazano je da je EMT ključni proces placentacije te da Hh signalizacija potiče Gli ekspresiju u stanicama citotrofoblasta [36]. Hh signalni put povezan je s drugim signalnim putevima kao što su: TGF- $\beta$ , EGFR, K-RAS, PKA, Notch i Wnt/  $\beta$ -katenin i drugi [37]. Koji signalni put u stanici će se aktivirati i kakva će reakcija biti ovisi o tipu stanice kojoj je signal upućen pa će se tako kod EMT eksprimirati Snail1, TWIST2, MMP-9 [38]. Unatoč dosadašnjim istraživanjima još je nepoznanica u razumijevanju ovog puta [39].

Poremećaj u funkcioniranju signalnog puta Hh povezan je s razvojnim anomalijama i nastankom tumora. Prema dosadašnjim istraživanjima Hh signalni put pridonosi razvoju jedne trećine svih malignih tumora [40].



Aberantna aktivacija Hh signalnog puta uzrokovana je mutacijama gena ili pretjeranom ekspresijom Hh signalnih molekula. Inhibicija Hh puta dovodi do suprimiranja rasta tumorskih stanica, njihove sposobnosti invazije okolnih tkiva i stanične pokretljivosti. Istraživanje inhibitora Hh signalnog puta smatra se važnim za liječenje pacijenata s uznapredovalim karcinomima u budućnosti.

### **1.3.1 Protein Ptch1**

Hh signalnom putu pripadaju dva transmembranska proteina koji imaju ulogu receptora ovog puta: Ptch i Smo [41]. Za razliku od drugih receptora koji imaju ulogu aktivatora ovog puta Ptch djeluje kao inhibitor. U nedostatku Hh liganda Ptch1 protein funkcionira tako da održava Hh signalni put u neaktivnom stanju inhibiranjem translokacije signalnog proteina Smo do primarne cilije. Hh ligandi aktiviraju signalni put u ciljnim stanicama vezanjem na Ptch1 receptor i stimuliranjem internalizacije i lizosomske degradacije Hh–Ptch1 kompleksa, čime se ublažava represivni učinak na Smo. Do sada su istražena dva tipa Ptch receptora, Ptch1 i Ptch2, koji mogu inhibirati Smo. Shh, Ihh i Dhh ligandi se mogu vezati za oba Ptch receptora. Ptch1 i Ptch2 geni imaju različitu ekspresiju tijekom epidermalnog razvoja tako da je Ptch1 primarno izražen u mezenhimalnim stanicama koje proizvode Shh protein, a Ptch2 u epitelnim stanicama kože i testisa [42, 43].

Vezanje liganda na Ptch1 predstavlja mehanizam aktivacije Smo [44]. Aktivirani Smo se naknadno translocira na primarnu ciliju gdje aktivira faktore transkripcije Gli za ulazak u jezgru te inicira transkripciju ciljnih gena, među njima i Ptch1. Ptch1 kodira transmembranski glikoprotein koji pokazuje dvostruke regulatorne aktivnosti. Ne samo da Ptch1 funkcionira za održavanje Smo u inaktivnom stanju, već i transkripcijska aktivacija Ptch1 kao Hh ciljnog gena također funkcionira kao kritična regulatorna petlja negativne povratne sprege koja služi za prigušivanje aktivnosti puta kroz sekvestraciju Hh liganda [45]. Kada se ligand veže za Ptch1 on ne može više izbacivati slobodni kolesterol koji se potom nakuplja i zauzima mjesto na Smo receptoru što aktivira Smo. Nakon vezanja Shh na Ptch1 prestaje inhibicija Smo, dolazi do aktivacije puta, prijenosa i modeliranja Gli transkripcijskih faktora koji ulaze u jezgru i aktiviraju transkripciju ciljnog gena. Transkripcija se odvija pod kontrolom protein kinaze A (PKA) [46]. Dosadašnja istraživanja nisu u potpunosti razjasnila kako se prenosi signal od Smo do Gli. Poznato je da regulacija ide preko Gli fosforilacije cikličkog AMP (cAMP) ovisne o PKA koja je najbitnija za stvaranje aktivatora. Kada je Ptch slobodan on inhibira Smo i potiče nakupljanje Smo na površini stanice [47].

### 1.3.2 Protein Smoothened

Smo protein je koreceptor u Hh signalnom putu, a pripada obitelji G-proteina vezanih za receptor (*engl. G-protein-coupled receptor, GPCR*) (224). GPCR čine najveću obitelj membranskih proteina koji posreduju u transmembranskoj transdukciji izvanstaničnih signala, uključujući endogene kemijske ligande i egzogene podražaje. Smo je GPCR klase F koji regulira fiziološki važan Hh signalni put. Smo je pozitivan regulator Hh signalnog puta koji potiče aktivaciju njegovih nizvodnih komponenti, a služi kao pretvarač signala koji potječe od Ptch1 i pod čijom je kontrolom [40, 48]. Mehanizam kojim Ptch1 inhibira Smo još uvijek nije jasan, a kao mogući regulatori Smo aktivnosti spominje se kolesterol [46]. Nakon vezanja Hh liganda na Ptch1 dolazi do aktivacije Smo koji se fosforilira pomoću PKA i prenosi signal u citoplazmu gdje je konačni cilj Gli protein [49]. Smatra se da signal nastaje kada se Smo veže na Gli-protein i tako snizi cAMP i inaktivira PKA i CK1 (*engl. casein kinase I, CK1*), a taj proces pomažu GRK2 (*engl. Gprotein-coupled receptor kinase 2, GRK2*) i  $\beta$ -arrestin kao kinaze G receptora [50]. Kada Hh ligand nije vezan za receptor, Ptch1 potiskuje Smo, a Gli se ne aktivira [51].

S obzirom na to da Smo djeluje preko protein kinaza pripada kanonskom Hh signalnom putu. Aktivacija kanonskog Hh puta rezultira supresijom proteolitičke razgradnje Gli proteina što povećava njihovu razinu u citoplazmi i jezgri a time i transkripciju ciljnih gena u Hh signalnom putu. Ovaj signalni put pokazuje visoku razinu aktivnosti u embrionalnom razvoju tkiva i organa, a nisku razinu aktivnosti u tkivima odraslih. Disregulacija puta, obično pojavom onkogenih mutacija, rezultira nastankom nekoliko karcinoma, uključujući karcinom bazalnih stanica i meduloblastom. Upravo je Smo ciljna molekula za razvoj novih antitumorskih lijekova [52].

### 1.3.3 Protein cripto-1

Cripto-1 je član obitelji epidermalnog faktora rasta (EGF-CFC), a utvrđeno da ima ulogu u embriogenezi, migraciji stanica i rastu tumora kroz procese epitelno mezenhimalne tranzicije gdje se epitelne stanice pretvaraju u pokretni mezenhimalni fenotipi i migriraju u druga područja tijela. Cripto-1 je neophodan tijekom embrionalnog razvoja ali ima i patološku ulogu u razvoju tumora i nastanku metastaza.

Cripto-1 aktivira više signalnih puteva djelujući preko transformirajućeg faktora rasta beta (TGF $\beta$ ) i snažan je induktor EMT [53]. Aktivnost proteina cripto-1 je također pod utjecajem

drugih signalnih puteva kao što su Wnt i  $\beta$ -katenin, a koreceptor je za Nodal, protein iz obitelji TGF- $\beta$  koji igra ulogu u diferencijaciji i regulaciji matičnih stanica [54, 55]. Dok cripto-1 i njegov koreceptor Nodal pokazuju povećanu ekspresiju kod različitih karcinoma, ta dva proteina potiču EMT kroz različite mehanizme neovisne jedan o drugom. Utvrđeno je da Nodal inducira EMT kroz fosforilaciju ERK1/2 (engl. extracellular signal-related kinase, ERK), dok cripto-1 koristi c-SRC signalizaciju za induciranje EMT [56, 57].

U ranom embrionalnom razvoju cripto-1 igra važnu ulogu u diferencijaciji zametnog sloja a kasnije u razvoju svakog organa. Posteljice stanice trofoblasta i tumorske stanice imaju slične biološke karakteristike, a cripto-1 može kontrolirati njihovu migraciju i invaziju.

Cripto-1 je jače izražen tijekom ranog embrionalnog razvoja, a slabije je izražen ili neaktivan u posteljici u drugom i trećem tromjesečju normalne trudnoće. Pojačana ekspresija cripto-1 može poremetiti normalne EMT i MET procese stanica trofoblasta i aktivirati patološke puteve koji će dovesti do produljenja i jačeg intenziteta invazije trofoblasta [58]. U embriogenezi cripto-1 ima ulogu u indukciji EMT-a, a u tumorogenezi potiče angiogenezu endotela [59].

Cripto-1 smanjuje regulaciju E-kadherina i povećava N-kadherin. E-kadherin je ključan za adheziju između stanica osobito u epitelnim tkivima, a N-kadherin potiče agregaciju stanica i invaziju malignih stanica [60, 61].

Cripto-1 je u tkivima odraslih slabo izražen, dok su cripto-1 mRNA i/ili proteini povišeni u nekoliko različitih tipova ljudskih tumora, uključujući rak dojke, debelog crijeva, pluća, želuca, gušterače, jajnika i testisa. Onkogeni aktivnost cripto-1 povezana je s aktivacijom glipikan-1/ras/c-src/mitogenom-aktivirane protein kinaze (MAPK) i fosfatidilinozitol 3' kinaznih (PI3K)/AKT puteva, kao i inhibicijom tumorskog faktora rasta  $\beta$ 1. Visoka ekspresija cripto-1 u karcinomima i nedostatak ili niske razine ekspresije u normalnim tkivima čini ga potencijalnom molekulom za razvoj novih antitumorskih lijekova [62].

### **1.3.4 Protein survivin**

Survivin pripada grupi inhibitora proteina apoptoze (IAP), važne skupine proteina uključenih u regulaciju apoptoze. Budući da sudjeluju u regulaciji stanične smrti svaki poremećaj regulacije u funkciji IAP je povezan s razvojem raka, indukcijom onkogeneze ili rezistencijom na lijekove [63]. Survivin je najmanji IAP protein s jednom domenom BIR-a (Baculovirus IAP ponavljanja) na N-kraju i CC (engl. C terminus Coiled Coil) domenom. Od svih IAP proteina survivin pokazuje najmanju ekspresiju u tkivima odraslih a ima važnu ulogu u regulaciji stanične diobe

i inhibiciji apoptoze. Survivin je kodiran genom BIRC5 i sastoji se od 4 egzona i 3 introna na kromosomu 17q25. Istraživanja su pokazala da utječe na mitozu odnosno na stvaranje diobenog vretena. Survivin je jedinstven među proteinima koji inhibiraju apoptozu jer pokazuje ekspresiju reguliranu staničnim ciklusom koja doseže vrhunac tijekom mitoze. Prekomjerna ekspresija Survivina inhibira intrinzične i ekstrinzične putove apoptoze [64]. Smanjenje Survivina u ljudskim stanicama uzrokuje poremećaje apoptoze i stanične diobe [65]. Survivin inhibira mitohondrijski put apoptoze vezivanjem na pro-apoptičke proteine SMAC/DIABLO i na taj način sprečava aktivaciju kaspaze. SMAC/DIABLO proteini se oslobađaju iz mitohondrija i aktiviraju kaspazu-9 što inducira apoptozu [66].

Survivin ima dvostruku funkciju i to kao regulator stanične diobe i inhibitor apoptoze. Prisutan je u fetalnom tkivu i većini solidnih tumora u ljudi te sudjeluje u MET procesima [67].

Stanični procesi kao što su proliferacija, apoptoza, autofagija, EMT i drugi reguliraju se Gli transkripcijskim faktorima. Survivin je detektiran kao ciljani gen Hh puta i primarno je reguliran s Gli2 transkripcijskim faktorom [68].

U zdravim trudnoćama survivin je aktivan u citotrofoblastima i ključan je za očuvanje integriteta tkiva posteljice i uredne diferencijacije. Nedavne studije pokazuju da je ekspresija survivina smanjena kod preeklampsije i IUGR-a što je u korelaciji s povećanom apoptozom trofoblasta, dok se povećana ekspresija vidi kod gestacijske trofoblastne bolesti [69].

Ekspresija Survivina u tumorima korelira s inhibicijom apoptoze i smanjenom stopom stanične smrti te agresivnošću tumora i otpornošću na kemoterapiju. Ekspresija proteina survivina koristi se kao prognostički čimbenik u nekoliko različitih tumora. Visoka ekspresija survivina korelira s agresivnijim tumorima, smanjenim odgovorom na kemoterapiju te skraćenim vremenom preživljavanja u usporedbi s tumorima koji su survivin negativni. Iz tih razloga Survivin predstavlja ciljnu molekulu za razvoj imunoterapije i genske terapije tumora [70, 71].

#### **1.4 Intrauterini zastoj fetalnog rasta**

Intrauterini zastoj fetalnog rasta, prisutan u 5-10% trudnoća, jedan je od vodećih problema suvremene perinatologije zbog visokog perinatalnog morbiditeta i mortaliteta, a u uskoj je vezi s građom posteljice i nedostatnom posteljičnom perfuzijom koja dovodi do zastoja fetalnog rasta i kronične fetalne hipoksije [72, 73].

Intrauterini zastoj rasta fetusa se definira kao usporenje rasta fetusa koji zbog nedovoljne potpore za rast ne dosegne očekivanu porođajnu masu u određenoj gestacijskoj dobi (< 10. centile normativne krivulje).

Definicija intrauterinog zastoja fetalnog rasta temelji se na ultrazvučnoj procjeni. Oko 70% djece s porođajnom težinom ispod 10. centile je potpuno zdravo i to stanje se naziva idiopatskim zastojem rasta, a preostalih 30% zastoja rasta je patološko [74]. Od svih zastoja u rastu 20% djece u podlozi ima insuficijenciju posteljice koja se može utvrditi prenatalno ultrazvučnom i Doppler pretragom, a ova skupina djece je klinički najugroženija. U 10% djece sa zastojem rasta uzrok su kromosomske anomalije, poremećaji razvoja organa, infekcije (npr. citomegalovirus) te toksični okolišni čimbenici (nikotin, alkohol) [75].

Često se mijenjaju pojmovi, intrauterini zastoj rasta (engl. intrauterine growth restriction, IUGR) koji se još engleski naziva FGR (engl. fetal growth restriction, FGR) s pojmom djece rođene s malom porođajnom težinom za gestacijsku dob (engl. small for gestational age, SGA). Djeca mala za gestacijsku dob su ona čija je procijenjena težina ili opseg trbuha, odnosno porođajna težina manji od 10. centile za gestacijsku dob, spol i paritet majke.

Fetusi s malom težinom su u biti mali ali konstitucijski zdravi fetusi što je posljedica njihovog unaprijed određenog potencijala rasta. Dok su s druge strane fetusi s intrauterinim zastojem rasta izloženi povećanom kratkotrajnom i dugotrajnom perinatalnom morbiditetu i mortalitetu [76]. Da bi razlikovali IUGR od malog zdravog djeteta puno nam pomaže Doppler pupčane arterije [77].

Zastoj fetalnog rasta je složen, multifaktorijalni poremećaj koji mogu uzrokovati fetalni, okolišni, maternalni i uteroplacentarni čimbenici koji su najčešći uzrok nedostatne funkcije posteljice [78]. Trudnice s nižim socioekonomskim statusom, većim brojem trudnoća, određenom rasom, pušenjem, pothranjenosti, raznim sistemskim bolestima (kronična arterijska hipertenzija, sistemski eritematozni lupus, šećerna bolest) imaju povišeni rizik za IUGR.

Najčešći fetalni uzroci zastoja rasta su genetski poremećaji (kromosomski, mikro delecije/duplikacije, mutacije, epigenetski poremećaji), fetalne infekcije (citomegalovirus, toksoplazmoza, herpes, rubeola, sifilis, Zika virus, malarija) i malformacije, izloženost teratogenu (lijekovi, toksini), a uteroplacentarni čimbenici uključuju insuficijenciju posteljice [79].

Jedan od najčešćih uzroka intrauterinog zastoja rasta je poremećena funkcija posteljice na koju možemo posumnjati Dopplerskim ultrazvučnim mjerenjem protoka kroz majčine i fetalne krvne žile i to u drugom tromjesečju trudnoće [80, 81].

#### **1.4.1 Podjela intrauterinog zastoja fetalnog rasta**

Zastoj rasta fetusa može biti simetrični, asimetrični i mješoviti ovisno o tome koji su organi zahvaćeni zastojem.

Simetrični zastoj fetalnog rasta je posljedica smanjenog genetskog potencijala ili posljedica ranog djelovanja štetnih noksi na trudnoću. Biometrijski faktori rasta jednakomjerno su smanjeni, plod je malen i proporcionalan, a može se dijagnosticirati ultrazvučno prije 24. tjedna. Ovaj tip zastoja javlja se u oko 20-30% svih slučajeva [82].

Asimetrični tip zastoja je češći i javlja se u 70 -80 % slučajeva, a najčešće je vezan za insuficijenciju posteljice. Kod ovog tipa zastoja smanjeno je masno tkivo ploda odnosno smanjen je opseg trbuha dok su biparijetalni promjer, opseg glave i duljina bedrene kosti uredne veličine.

Rani zastoj rasta je onaj koji nastupi prije 32. tjedna gestacije i u vezi je s kromosomskim anomalijama, infekcijom ili ranom posteljičnom insuficijencijom dok kasni zastoj rasta započinje u zadnjem tromjesečju trudnoće i povezan je s disfunkcijom posteljice [75]. Rani i kasni zastoj rasta se razlikuju u težini, nalazu Dopplera, povezanosti s hipertenzivnim komplikacijama, promjenama na posteljici i terapijskom pristupu [83, 84, 85]. Rani IGUR ima prevalenciju od 0.5%-1%, teži je oblik, češće je povezan s patološkim nalazom Dopplera pupčane arterije i preeklampsijom.

Zastoj fetalnog rasta kao posljedica kronične posteljične insuficijencije (asimetrični zastoj rasta) drugi je vodeći čimbenik rizika perinatalne smrtnosti, a takvi fetusi imaju 5 do 10 puta veći rizik intrauterine smrti za koju se smatra da je „preventabilna“ [72]. Osim toga značajan je uzrok morbiditeta novorođenčadi poput cerebralne paralize i prematuriteta, a nosi prema Barkerovoj teoriji fetalnog programiranja kroničnih bolesti (engl. The Developmental Origins of Health and Disease, DOHaD) i doživotni rizik za neurološke, imunološke, kardiovaskularne i endokrinološke posljedice [86].

#### **1.4.2 Patohistološke promjene na posteljicama iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta**

Promjene u posteljici, koje su još uvijek nedovoljno istražene, a podrazumijevaju poremećenu krvno-žilnu opskrbu posteljice i oštećenje parenhima posteljice uzrokovane su hipoksično-ishemičnim oštećenjem i oksidativnim stresom a zajednički se nazivaju maternalna vaskularna malperfuzija (MVM). MVM tijekom trudnoće ukazuje na povišen rizik za rani nastanak kardiovaskularnih bolesti žena čije su trudnoće bile komplicirane s kroničnom posteljičnom insuficijencijom s posljedičnim zastojem fetalnog rasta. Naime, poznato je da te žene imaju 2-8 puta veći rizik nastanka kardiovaskularnih bolesti pa se smatra da posteljica predstavlja „prozor u majčino vaskularno zdravlje“ [87].

Patofiziološka osnova zastoja fetalnog rasta nalazi se u strukturnim i funkcionalnim promjenama krvnih žila posteljice. Posteljice iz trudnoća sa zastojem fetalnog rasta imaju makroskopski i mikroskopski vidljive patološke promjene koje se često detektiraju prekasno tj. nakon porođaja [88]. Neke histološke promjene češće se nalaze u posteljicama iz trudnoća kompliciranih IUGR uključujući infarkt resica, vaskularne promjene majčinih krvnih žila, morfološke promjene resica iako jedna četvrtina ovih posteljica nema morfoloških promjena na rutinskom pregledu. Posteljice iz trudnoća kompliciranih preeklampsijom i/ili IUGR porođene blizu termina imaju značajno nižu učestalost histoloških promjena u usporedbi s ranijim IUGR. Histološke promjene koje nalazimo u ovim posteljicama variraju od blagih promjena pa sve do teške uteroplacentarne vaskulopatije, ali nijedna patološka promjena ne pokazuje visoku osjetljivost ili specifičnost. Kod IUGR-a je poremećaj funkcije posteljice obilježen nepravilnom fuzijom i sincicijalizacijom trofoblasta što dovodi do poremećaja u stvaranju sinciciotrofoblasta i oštećene izmjene hranjivih tvari i plinova [89]. Teški IUGR s ranim početkom je povezan s patološkim promjenama uteroplacentarne perfuzije majke koja je posljedica poremećaja invazije ekstraviloznog trofoblasta. Moguće je da IUGR s kasnim početkom predstavlja heterogeniju skupinu s manje karakterističnim histološkim promjenama [90].

Najčešće patohistološke promjene kod posteljične insuficijencije su: posteljična hipoplazija, infarkt posteljice, retroplacentarno krvarenje, ubrzana vilozna maturacija, sincicijalni čvorići, decidualna vaskulopatija, zadebljanje trofoblastne bazalne membrane, smanjenje interviloznih prostora i nespecifične upalne lezije [90, 91].

### 1.4.3 Dijagnostika intrauterinog zastoja fetalnog rasta

Detekcija IGUR temelji se na otkrivanju fetusa koji su manji od očekivanog za gestacijsku dob fizikalnim pregledom (simfiza-visina fundusa) ili ultrazvukom. Standardna ultrazvučna fetalna biometrija uključuje procjenu opsega glave, biparijetalnog promjera, opsega trbuha i duljine bedrene kosti. Težina fetusa se procjenjuje na temelju različitih kombinacija navedenih biometrijskih mjerenja i njihovog uvrštavanja u standardizirane jednadžbe [92, 93].

Kod ranog IGUR povećani otpor Dopplera pupčane arterije je prvi znak naknadnog pogoršanja kardiovaskularnih i biofizičkih parametara dok je kod kasnog IUGR kardiovaskularno pogoršanje kao odgovor na fetalnu hipoksiju uglavnom ograničeno na cerebralnu cirkulaciju s malim promjenama Dopplera pupčane arterije [94, 95, 96, 97]. Doppler pupčane arterije se preporučuje za praćenje IUGR jer procjenjuje hemodinamski aspekt disfunkcije posteljice. Jačina otpora krvotoka posteljice primarni je čimbenik koji određuje stopu kliničke progresije zastoja rasta fetusa kod ranog IUGR [94, 98].

Probir i rana detekcija trudnoća kod kojih će se napredovanjem gestacije razviti kronična posteljična insuficijencija s posljedičnim zastojem fetalnog rasta, predmet su mnogih suvremenih istraživanja, poglavito biomarkera poput trudničkog plazmatskog proteina-A (*engl. pregnancy associated plasma protein A; PAPP-A*), humanog korionskog gonadotropina (*engl. human chorionic gonadotropin; HCG*) ili posteljičnog čimbenika rasta (*engl. placental growth factor; PGF*) koji se danas koriste kao probirni testovi prvog tromjesečja u redovnoj kliničkoj praksi [99, 100]. Niska razina PAPP-A, posteljičnog glikoproteina kojeg proizvodi sinciotrofoblastni sloj, često se smatra indikacijom za pažljivije praćenjem rasta fetusa [97]. Niska vrijednost PAPP-A u prvom tromjesečju i visokog alfa-proteina u drugom tromjesečju govori u prilog teškog IUGR [101]. Na povećani rizik od IUGR ukazuje i povišena razina HCG-a u drugom tromjesečju [102]. PGF je proangiogeni čimbenik snažno izražen u sinciotrofoblastu i endotelu majke, a poremećaj placentacije povezan je s smanjenom proizvodnjom ovog proteina u posteljici dok je niska razina PGF-a u prvom tromjesečju povezana s nepovoljnim ishodom trudnoće uključujući preeklampsiju i IUGR [103, 104, 105, 106].

Trudnice s povišenim rizikom za razvoj kronične posteljične insuficijencije intenzivno se antenatalno monitoriraju i programirano porađaju uz pojačanu opstetričku skrb kako bi se osigurao čim bolji perinatalni ishod. Unatoč tome oko 50% zastoja fetalnog rasta otkrije se tek po porodu. Rizik spontanog prijevremenog poroda kod IUGR je trostruko veći u odnosu na



uredne trudnoće. Trenutno u rutinskoj kliničkoj praksi ne postoji niti jedan test probira koji bi s velikom vjerojatnošću predvidio IUGR.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

### OPĆI CILJ:

Istražiti ulogu proteina Hedgehog signalnog puta u procesu epitelno-mezenhimalne tranzicije kao biološkog mehanizma koji sudjeluje u razvoju placentalne insuficijencije s posljedičnim zastojem fetalnog rasta, te utvrditi ulogu cripto-1 i survivina u razvoju kronične posteljice insuficijencije sa zastojem fetalnog rasta.

### SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Ispitati semikvantitativno razinu ekspresije proteina Ptch1 i Smo, kao pozitivnih regulatora signalnog puta Hh, u posteljicama iz trudnoća kompliciranih sa zastojem fetalnog rasta i u posteljicama iz urednih trudnoća.
2. Ispitati semikvantitativno razinu ekspresije proteina cripto-1 i survivina u posteljicama iz trudnoća kompliciranih sa zastojem fetalnog rasta i u posteljicama iz urednih trudnoća.
3. Odrediti ekspresijski obrazac pojedinačnih proteina na Hedgehog signalni put.
4. Ispitati međusobnu povezanost imunohistokemijske ekspresije proteina s morfološkim promjenama u posteljicama iz trudnoća kompliciranih sa zastojem fetalnog rasta.

### Hipoteza istraživanja:

U posteljicama koje prati zastoj fetalnoga rasta očekuje se pojačana ekspresija Ptch 1 i Smo proteina, a oslabljena ekspresija cripto-1 i survivin proteina u odnosu na normalne posteljice s urednim fetalnim rastom.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1 Materijali**

Istraživanje je provedeno na arhivskim uzorcima humanih posteljica pohranjenih na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Rijeka, a prikupljenih tijekom porođaja na Klinici za ginekologiju i porodništvo KBC Rijeka. Analizirane su 122 posteljice iz terminskih trudnoća ( $\geq 37$  tjedana) kompliciranih sa zastojem fetalnog rasta, dok je kontrolnu skupinu činila 31 posteljica iz terminskih trudnoća ( $\geq 37$  tjedana) koje su protekle bez komplikacija uz zadovoljavajući fetalni rast, a usklađene su s ispitivanom skupinom u pogledu epidemioloških podataka.

Koristili su se relevantni medicinski podatci (gestacijska dob, paritet i dob majke, rezultati ultrazvučnih nalaza serijske biometrije fetusa, porođajna masa, spol novorođenčadi, masa posteljice, te fetoplacentarni omjer) iz elektronske baze porođaja Klinike za ginekologiju i porodništvo KBC Rijeka. Kriteriji uključivanja u studiju su dijagnoza zastoja fetalnog rasta postavljena serijskim ultrazvučnim mjerenjima fetalne biometrije (najmanje 2) s procjenom tjelesne težine ispod 5. centile za gestacijsku dob i spol, a koja je potvrđena mjerenjem porođajne mase novorođenčeta, spola ploda, pariteta majki, mase posteljice te fetoplacentarnog omjera. Kriteriji isključivanja iz studije su: višeplodna trudnoća, intrauterine virusne infekcije, korioamnionitis, kronična hipertenzija, autoimune bolesti majke, kromosomopatije fetusa i kasne fetalne smrti.

U ispitivanoj skupini trudnoća kompliciranih sa zastojem fetalnog rasta analizirali su se uzorci iz trudnoća koje su komplicirane preeklampsijom i bez nje, s patološkim i urednim Dopplerskim nalazom te postojećim markerima trofoblastnog rasta, a podatci su se usporedili s ekspresijom ispitivanih tkivnih markera.

#### **3.2 Metode**

##### **3.2.1 Patomorfološka analiza posteljice**

Patohistološka analiza posteljice uključuje makroskopski i mikroskopski pregled od strane specijaliste patologa. Sve posteljice pregledane su prema standardiziranom protokolu. Makroskopskim pregledom svježe odnosno nefiksirane posteljice određuje se veličina i težina posteljice, mjesto insercije pupkovine, veličina te sve makroskopske promjene ako su uočene. Uzorci za histološku analizu se preuzimaju prema standardiziranom protokolu.

Za potrebe ovog istraživanja, dva neovisna istraživača, patolog i doktorand istraživač u ovom slučaju, su pregledavali imunohistokemijski obojene preparate prethodno selektiranih uzoraka histokemijski analiziranih posteljica s dijagnosticiranim morfološkim kriterijima zastoja rasta.

Dijagnostički morfološki kriteriji zastoja rasta uključuju makroskopske i mikroskopske promjene na posteljici, a to uključuje placentarnu hipoplaziju ( težina posteljice manja od 10. centile za gestacijsku dob i/ili promjer pupkovine manji od 10. centile za gestacijsku dob), infarkt posteljice, retro i placentarna krvarenja te na mikroskopskoj razini deponiranje interviloznog fibrina, distalna vilozna hipoplazija, sincicijski čvorići, decidualna vaskulopatija i ubrzana zrelost resica.

### **3.2.2 Imunohistokemijska metoda detekcije ekspresije biljega u posteljici**

Ekspresija biljega u posteljici određena je korištenjem imunohistokemijske metode. Preparati fiksirani u formalinu uklopljeni su u parafinske blokove te rezani na rezove debljine 5 µm. Najprije su rezovi obojeni hematoksilin-eozinom te analizirani mikroskopski. Mikroskopska analiza provedena je na tkivu posteljice, ovoja i pupkovine. Iz odabranih donorskih kocaka napravljene su tkivne rešetke uklopljene u parafin (TMA). Donorska kocka je stručni termin kojim se objašnjava da se cilindar tkiva iz jedne kocke (*engl. „donor block“*) stavlja u novoformiranu primateljsku TMA kocku (*engl. „recipient block“*). Za izradu jedne TMA kocke možemo koristiti i do 100 donorskih kocaka što pojednostavljuje odnosno ubrzava analizu. TMA kocke su se tijekom noći inkubirale u termostatu na 37°C. Nakon toga su rezane na rezove debljine 5 µm i primijenjen je postupak deparafinizacije prema protokolu: zamjena za ksilol (3 puta po 10 minuta), rehidracija u alkoholu (100% alkohol 2 puta po 5 minuta, 96% alkohol 5 minuta, 70% alkohol 5 minuta), ispiranje u destiliranoj vodi. Obnova antigena je postupak pri kojem rezove na staklima inkubiramo u određenoj otopini (citratni pufer) da bismo razotkrili željeni antigen. Uzorci su se predtretirali u citratnom puferu (Dako No. S2031), pH 6,1 (Code No. S2031), u omjeru 1:9, u mikrovalnoj pećnici (Samsung Selection M92) pri primjeni primarnih protutijela (Ptch1 (Anti-Patched/PTCH1 antibody Abcam 53715), Smo (Anti-Smoothed antibody Abcam ab113438), cripto-1 (Anti-Cripto 1 antibody Abcam ab19917), survivin (Anti-Survivin antibody Abcam ab469) (3 puta po 5 minuta), dok je predtretman za protutijelo cripto-1 primjena proteinaze K (4 minute). Stakla s histološkim preparatima su potpuno stavljena u Dako Techmate Horizon automatski uređaj za imunohistokemijsko bojanje (LJL Biosystems Inc.) uz primjenu imunoperoksidaznog (Microwave Streptavidin Immunoperoxidase, MSIP, *engl.*) protokola. Imunohistokemijsko bojanje temeljeno na

Labelled Strepta-Avidin-biotin (LSAB) vizualizacijskom sistemu (DAKO Chem Mate™ Detection Kit, No. K 5001) provedeno je u automatskom uređaju za imunohistokemijsko bojanje (Tech Mate™ Horizon). Diaminobenzidin (DAB) i Nuclear Fast Red su korišteni kao kromogeni. Nakon vizualizacije kromogena uslijedilo je kontrastiranje hematoksilinom kroz 2 minute, ispiranje u hladnoj vodi i pokrivanje medijem za pokrivanje (Shandon histomount). Za sva razrjeđenja i ispiranja između pojedinih faza korišten je 0,005 M TRIS-HCl pufer, pH=7,6. Kao negativne kontrole u svim imunohistokemijskim bojanjima koristili su se histološki rezovi na koje se umjesto primarnih protutijela nanosi puferska otopina.

Protutijela za imunohistokemijska bojanja koja su se koristila su sljedeća:

- Anti-Patched/PTCH1 (ab53715, Abcam; zečje poliklonalno protutijelo; razrijeđeno u omjeru 1:50 sa DAKO Antibody Diluent S0809)
- Anti-Smoothed (ab113438, Abcam; zečje poliklonalno protutijelo; razrijeđeno je u omjeru 1:75 sa DAKO Antibody Diluent S0809)
- Anti-Survivin (ab469, Abcam; zečje poliklonalno protutijelo; razrijeđeno je u omjeru 1:250 sa DAKO Antibody Diluent S0809)
- Anti-Cripto1 (ab19917, Abcam; zečje poliklonalno protutijelo; razrijeđeno je u omjeru 1:100 sa DAKO Antibody Diluent S0809)

### **3.2.3 Kvantifikacija ekspresije Ptch1, Smo, cripto-1 i survivina**

Kvantificiranje je provedeno analizom skeniranih imunohistokemijski obojenih preparata. Ekspresija Ptch1, Smo, cripto-1 i survivina na imunohistokemijskim preparatima je prikazana u vidu apsolutnih vrijednosti s obzirom na postotak pozitivno obojenih stanica na 100 izbrojenih stanica. Postotak pozitivnih stanica (PPS) smo označavali sljedećim vrijednostima: 0 (bez vidljive reakcije), 1 (< 10% pozitivnih stanica), 2 (10-50% pozitivnih stanica), 3 (51-80% pozitivnih stanica), 4 (> 81% pozitivnih stanica). Intenzitet reakcije (IR) u stanicama smo označavali vrijednostima: 0 (bez vidljive reakcije), 1 (slab intenzitet reakcije), 2 (umjereno jak intenzitet reakcije), 3 (jak intenzitet reakcije). Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) čini umnožak PPS i IR, a prema njegovoj vrijednosti određene su skupine: 0-1 (nema reakcije), 2-3 (slabo izražen indeks bojanja), 4-8 (umjereno izražen indeks bojanja), 9-12 (jako izražen indeks bojanja) [107, 108, 109].

### **3.3 Statistička obrada podataka**

Statistička analiza je provedena s pomoću računalnog programa SPSS v.23. Vrijednosti ispitivanih varijabli prikazane su u tablici te grafički. Distribucije kvantitativnih varijabli testirane su na normalnost raspodjele Kolmogorov-Smirnovljevim testom i Shapiro-Wilk testom, a homogenost varijance Levenovim testom. Razlike među grupama kontinuiranih varijabli testirane su parametrijskim t-testom odnosno neparametrijskim Mann-Whitney testom ovisno o prirodi podataka. Za usporedbu kategorijskih varijabli korišten je Hi-kvadrat test ili Fisher-ov egzaktni test ovisno o prirodi podataka. Statistička značajnost razmatrana je na razini  $P < 0,05$ .

#### 4. REZULTATI

U ovom istraživanju određena je ekspresija proteina patched 1, smoothened, cripto-1 i survivina u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i uspoređena s ekspresijom istih biljega u posteljicama iz urednih trudnoća. Ekspresija navedenih proteina određena je i u posteljicama trudnoća koje su komplicirane s preeklampsijom i u posteljicama trudnoća s urednim i patološkim Dopplerskim nalazom pupčane arterije i arterije cerebri medije te postojećim markerima trofoblastnog rasta ( $\beta$  hCG i PAPP-A).

Prosječna starost ispitanica u skupini sa zastojem fetalnog rasta je bila trideset i pet godina ( $SD \pm 5.80$ ), a u kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama trideset i tri godine ( $SD \pm 4.02$ ).

Prosječno trajanje trudnoće u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta je iznosila trideset i devet tjedana ( $SD \pm 1.19$ ) odnosno isto kao i u kontrolnoj skupini ( $SD \pm 1.05$ ).

Ultrazvučno mjereni biparijetalni promjer glave fetusa je iznosio prosječno 89.65 mm ( $SD \pm 5.76$ ), dužina bedrene kosti 69.20 mm ( $SD \pm 5.87$ ) a prosječni opseg trbuha je iznosio 304.01 mm ( $SD \pm 23.59$ ) u skupini sa zastojem fetalnog rasta. Ultrazvučna mjerenja za skupinu ispitanica s urednim trudnoćama nisu bila dostupna.

Određena je i prosječna težina ploda u skupini sa zastojem fetalnog rasta koja je iznosila 2542.21 g ( $SD \pm 255.90$ ), a u skupini s urednim trudnoćama 3487.10 g ( $SD \pm 402.71$ ). Ostala praćena kontinuirana obilježja su izmjerena samo u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta, a prosječna vrijednost fetoplacentarnog omjera je iznosila 351.83 ( $SD \pm 79.81$ ),  $\beta$ hCG-a 38.69 IU/L ( $SD \pm 21.32$ ) odnosno 1.14 MoM ( $SD \pm 0.60$ ) i PAPP-A 2664.05 mIU/L ( $SD \pm 1496.10$ ). Rezultati su prikazani u Tablici 1.

Tablica 1. Podaci o izmjerenim kontinuiranim obilježjima u skupini sa zastojem fetalnog rasta (1) i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama (0) (UZV1= biparijetalni promjera; UZV2=dužina bedrene kosti; UZV3=opseg trbuha; Fp=fetoplacentarni omjer;  $\beta$ hCG=humani koronski gonadotropin; PAPP-A=plazmatski protein trudnoće A)

| Statistički podaci |       |    |                     |                       |                                         |
|--------------------|-------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
|                    | Grupa | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
| Dob1               | 0     | 31 | 33.06               | 4.016                 | .721                                    |

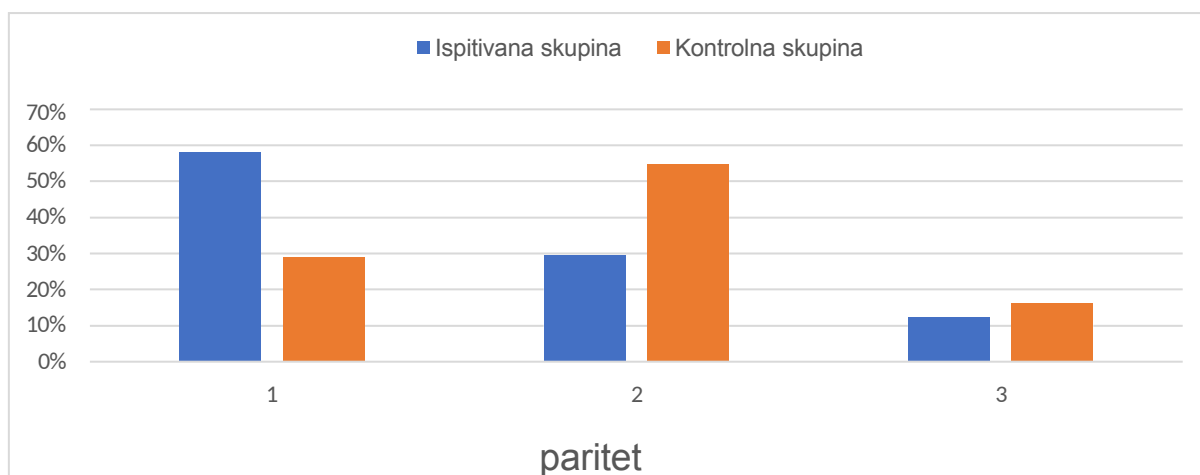
|                |   |     |           |            |           |
|----------------|---|-----|-----------|------------|-----------|
|                | 1 | 120 | 35.33     | 5.798      | .529      |
| Tjedni         | 0 | 31  | 39.742    | 1.0513     | .1888     |
|                | 1 | 122 | 39.378    | 1.1917     | .1079     |
| UZV1           | 0 | 0   | .         | .          | .         |
|                | 1 | 79  | 89.658    | 5.7577     | .6478     |
| UZV2           | 0 | 0   | .         | .          | .         |
|                | 1 | 79  | 69.203    | 5.8734     | .6608     |
| UZV3           | 0 | 0   | .         | .          | .         |
|                | 1 | 79  | 304.013   | 23.5946    | 2.6546    |
| Težina ploda   | 0 | 31  | 3487.10   | 402.709    | 72.329    |
|                | 1 | 122 | 2542.21   | 255.897    | 23.168    |
| Fp omjer       | 0 | 0   | .         | .          | .         |
|                | 1 | 121 | 351.83    | 79.813     | 7.256     |
| BhCG (IU/L)    | 0 | 0   | .         | .          | .         |
|                | 1 | 34  | 38.6876   | 21.32308   | 3.65688   |
| BhCG (MoM)     | 0 | 0   | .         | .          | .         |
|                | 1 | 34  | 1.1362    | .60244     | .10332    |
| PAPP-A (mIU/L) | 0 | 0   | .         | .          | .         |
|                | 1 | 34  | 2664.0471 | 1496.10341 | 256.57962 |
| PAPP-A (MoM)   | 0 | 0   | .         | .          | .         |
|                | 1 | 34  | 1.0806    | .57083     | .09790    |

U odnosu na broj trudnoća u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta (n=122) imali smo sedamdeset i jednu prvorotku (58,2%), trideset i šest drugorotki (29,5%) te petnaest ispitanica s tri ili više trudnoća (12,3%) dok smo u kontrolnoj skupini (n=31) imali devet prvorotki (29,0%), sedamnaest drugorotki (54,8%) i pet ispitanica s tri ili više trudnoća (16,1%). Rezultati su prikazani u Tablici 2 i na Slika 1.

Tablica 2. Prikaz pariteta u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini s urednom trudnoćom

| Paritet | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|---------|--------------------|-------------------|
| 1       | 71 (58.2%)         | 9 (29.0%)         |
| 2       | 36 (29.5%)         | 17 (54.8%)        |
| 3+      | 15 (12.3%)         | 5 (16.1%)         |



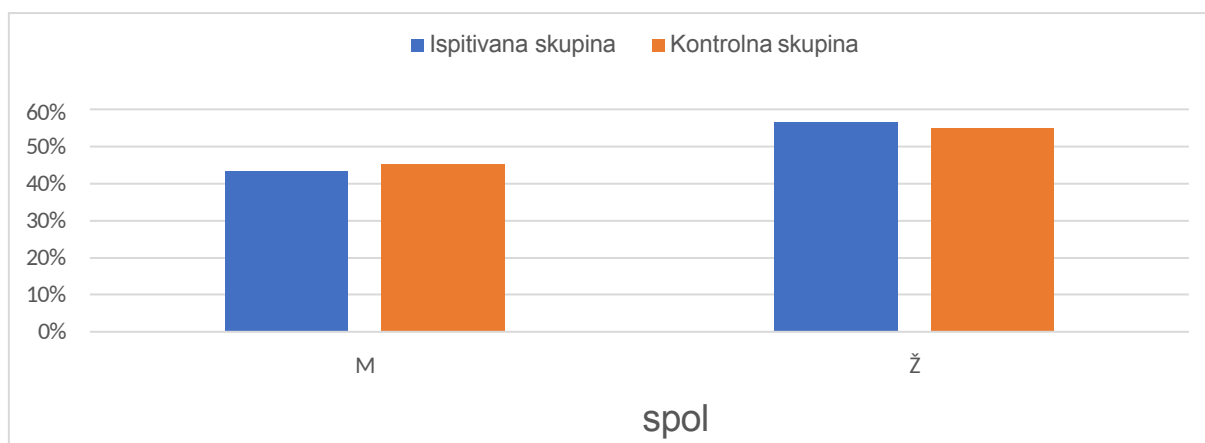


Slika 1. Grafički prikaz pariteta u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama

Nadalje, podaci su pokazali da je prema spolu djeteta u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta utvrdili pedeset i tri muška djeteta (43,4%) i šezdeset i devetero ženske djece (56,6%), dok je u kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama imali četrnaest djece muškog spola (45,2%) i sedamnaest djece ženskog spola (54.8%). Rezultati su prikazani u Tablici 3 i na Slici 2.

Tablica 3. Prikaz podataka o spolu djece u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalno rasta i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama (M=muški spol; Ž=ženski spol)

| Spol | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|------|--------------------|-------------------|
| M    | 53 (43.4%)         | 14 (45.2%)        |
| Ž    | 69 (56.6%)         | 17 (54.8%)        |



Slika 2. Grafički prikaz prema spolu djece u skupini sa zastojem fetalnog rasta i u kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da postoji značajna statistička razlika u paritetu između ispitanica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolne skupine s urednim trudnoćama ( $p=0.012$ , Hi-kvadrat test). U ispitivanoj skupini kod prvorotki je zabilježeno najviše slučajeva zastoja fetalnog rasta..

Nije utvrđena statistički značajna razlika u spolu djece između skupine sa zastojem fetalnog rasta i kontrolne skupine s urednim trudnoćama ( $p=0.863$ , Hi.kvadrat test). Navedeni rezultati su prikazani u Tablici 4.

Tablica 4. Podaci hi-kvadrat korelacijskog test usporedbe pariteta i spola u skupini sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama

|         |            |              |
|---------|------------|--------------|
| paritet | Hi-kvadrat | 8.878        |
|         | df         | 2.000        |
|         | Sig        | <b>0.012</b> |
| spol    | Hi-kvadrat | 0.030        |
|         | df         | 1.000        |
|         | Sig        | 0.863        |

Nadalje je istraživanje pokazalo da postoji statistički značajna razlika u težini ploda i dobi majki između ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na kontrolnu skupinu s urednim trudnoćama ( $p<0.05$ , Levene test). Međutim, nije nađena značajna statistička razlika u tjednima trudnoće između ispitivanih skupina ( $p=0.278$ , Levene test). Rezultati su prikazani u Tablici 5.

Tablica 5. Podaci Levene korelacijskog testa usporedbe tjedana trudnoće, težine ploda i dobi majke između ispitanica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolne skupine s urednim trudnoćama.

| Test za nepovezane skupne (Independent sample test) |                                        |             |                   |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------|-------------------|
|                                                     |                                        | Levene test | p                 |
| Tjedni trudnoće                                     | Pretpostavljene jednake varijance      | .278        | 0.123             |
| Težina ploda                                        | Nisu pretpostavljene jednake varijance | .000        | <b>&lt; 0.001</b> |
| Dob majke                                           | Nisu pretpostavljene jednake varijance | .038        | <b>0.042</b>      |

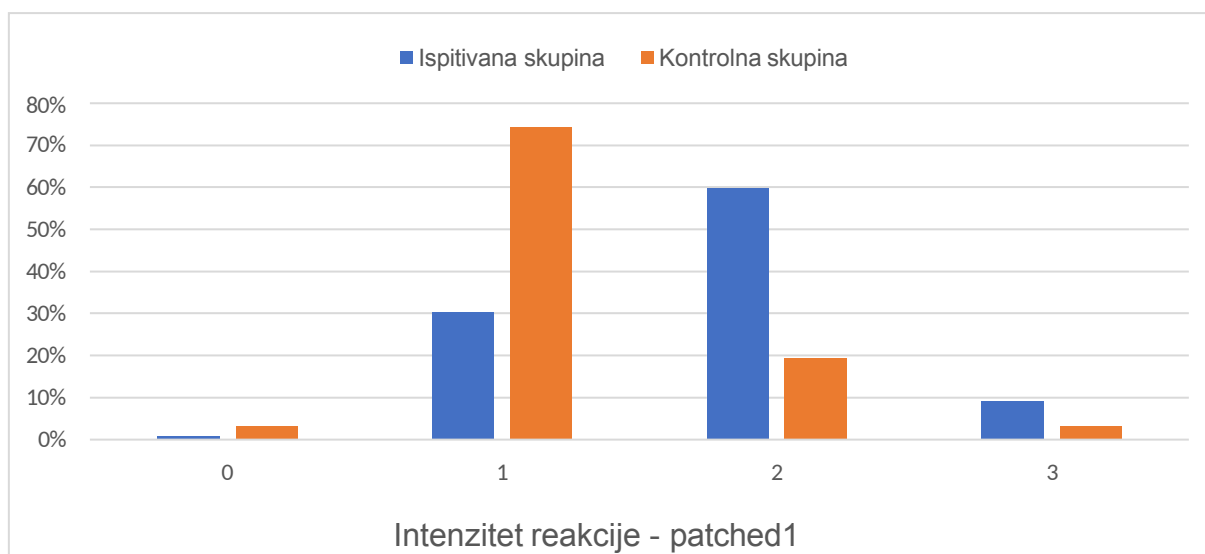
#### 4.1 Ekspresija proteina Ptch1 u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolama

U ovom istraživanju uspoređena je ekspresija proteina Ptch1 u terminskim posteljicama sa zastojem fetalnog rasta (n=122) s njegovom ekspresijom u posteljicama iz urednih terminskih trudnoća (n=37).

Ekspresija Ptch1 proteina prikazana je i analizirana prema intenzitetu reakcije (IR) u stanicama u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća. U ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je evidentiran u sedamdeset i tri posteljice (59.8%), dok je u kontrolnoj skupini najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 1 koji je zapažen u dvadeset i tri posteljice (74.2%). Rezultati su prikazani u Tablici 6 i na Slici 3.

Tablica 6. Intenzitet stanične reakcije za Ptch1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća (IR=intenzitet reakcije, 0=bez vidljive reakcije, 1=slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije, 3=jak intenzitet reakcije)

| Intenzitet reakcije – Ptch1 | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|
| 0                           | 1 (0.8%)           | 1 (3.2%)          |
| 1                           | 37 (30.3%)         | 23 (74.2%)        |
| 2                           | 73 (59.8%)         | 6 (19.4%)         |
| 3                           | 11 (9%)            | 1 (3.2%)          |



Slika 3. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za Ptch1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama

S obzirom na manji broj IR za Ptch1 u skupinama 0 i 3 svi uzorci su svedeni na dvije skupine iz čega proizilazi da je u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je evidentiran u osamdeset i četiri posteljice (68.9%) dok je u kontrolnoj skupini najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 1 koji je zapažen u dvadeset i četiri posteljice (77.2%). Rezultati su prikazani u Tablici 7.

Tablica 7. Intenzitet stanične reakcije za Ptch1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća (1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

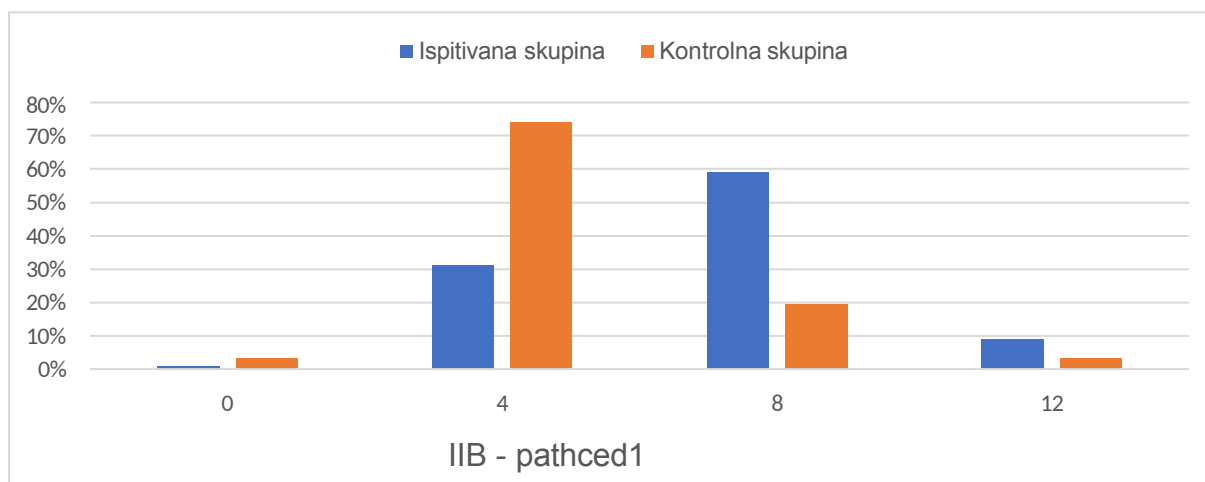
| Intenzitet reakcije - Ptch1 | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|
| 0,1=1                       | 38 (31.1%)         | 24 (77.4%)        |
| 2,3=2                       | 84 (68.9%)         | 7 (22.6%)         |

Zatim je imunohistokemijski kvantificirana Ptch1, Smo, cripto-1 i survivin ekspresija izražena u vidu apsolutnih brojeva koji se odnose na pozitivno obojene stanice na 100 izbrojenih stanica te izraženo u postotku. Postotak pozitivnih stanica (PPS) je za sve ispitivane proteine bio veći od 81% i svi su svrstani u kategoriju 4.

Ekspresija Ptch1 proteina iskazana je putem imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) koji čini umnožak PPS-a i IR-a te je prema njegovoj vrijednosti ekspresija podijeljena u 4 skupine. U ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta ekspresija Ptch1 odnosno IIB najviše je bio izražen u skupini 8, a evidentiran je u sedamdeset i dvije posteljice (59%), dok je u kontrolnoj skupini najviše bio zastupljen IIB u skupini 4 koji je zapažen u dvadeset i tri posteljice (74.2%). Rezultati su prikazani u Tablici 8 i na Slici 4.

Tablica 8. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za Ptch1: 0-1 (nema reakcije), 2-3 (slabo izražen indeks bojanja), 4-8 (umjereno izražen indeks bojanja), 9-12 (jako izražen indeks bojanja)

| IIB – Ptch1 | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|-------------|--------------------|-------------------|
| 0           | 1 (0.8%)           | 1 (3.2%)          |
| 4           | 38 (31.1%)         | 23 (74.2%)        |
| 8           | 72 (59%)           | 6 (19.4%)         |
| 12          | 11 (9%)            | 1 (3.2%)          |



Slika 4. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

S obzirom na manji broj IIB za Ptch1 u skupinama 0 i 12 sve uzorke smo sveli na dvije skupine iz čega proizilazi da je u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta najviše bio zastupljen indeks bojanja 8 koji je evidentiran u osamdeset i tri posteljice (68%), dok je u kontrolnoj skupini najviše bio zastupljen indeks bojanja 4 koji je zapažen u dvadeset i četiri posteljice (77.2%). Rezultati su prikazani u Tablici 9.

Tablica 9. Imunohistokemijski indeks bojanja za Ptch1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama (4= slabo izražen indeks bojanja, 8= jak intenzitet bojanja)

| IIB – Ptch1 | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|-------------|--------------------|-------------------|
| 0,4=4       | 39 (32%)           | 24 (77.4%)        |
| 8,12=8      | 83 (68%)           | 7 (22.6%)         |

U ovom istraživanju smo utvrdili značajnu statističku razliku u ekspresiji Ptch1 između posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnih posteljica iz urednim trudnoća s obzirom na intenzitet reakcije stanica ( $p < 0.001$ , Hi-kvadrat test) i imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) ( $p < 0.001$ , Hi-kvadrat test). Rezultati su prikazani u Tablici 10.

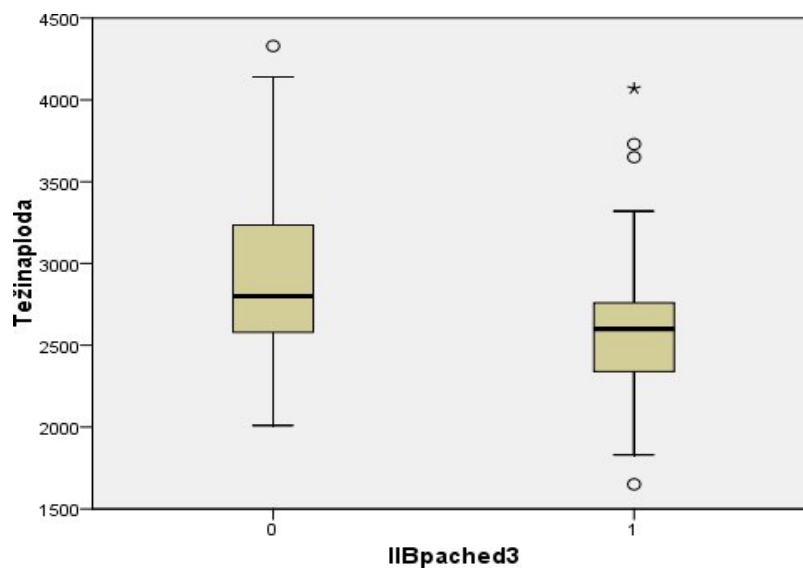
Tablica 10. Hi-kvadrat korelacijski test usporedbe intenziteta reakcije i imunohistokemijskog indeksa bojanja za Ptch1 u skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

|                             |            |                                  |
|-----------------------------|------------|----------------------------------|
| Intenzitet reakcije – Ptch1 | Hi-kvadrat | 21.959                           |
|                             | df         | 1.000                            |
|                             | Sig        | <b><math>p &lt; 0.001</math></b> |
| IIB – Ptch1                 | Hi-kvadrat | 21.086                           |
|                             | df         | 2.000                            |
|                             | Sig        | <b><math>p &lt; 0.001</math></b> |

Također smo utvrdili značajnu statističku razliku u težini ploda između ispitanica s nižim imunohistokemijskim indeksom bojanja (IIB=4) za Ptch1 u odnosu na viši imunohistokemijski indeks (IIB=8) mjeren Levene korelacijskim testom usporedbe ( $p<0,05$ ). Ispitanice s višim vrijednostima IIB za Ptch1 rađale su djecu manje porođajne težine. U svim ostalim promatranim kategorijalnim obilježjima nije utvrđena statistički značajna razlika kod ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na imunohistokemijski indeks bojanja. Rezultati su prikazani u Tablici 11 i na Slici 5.

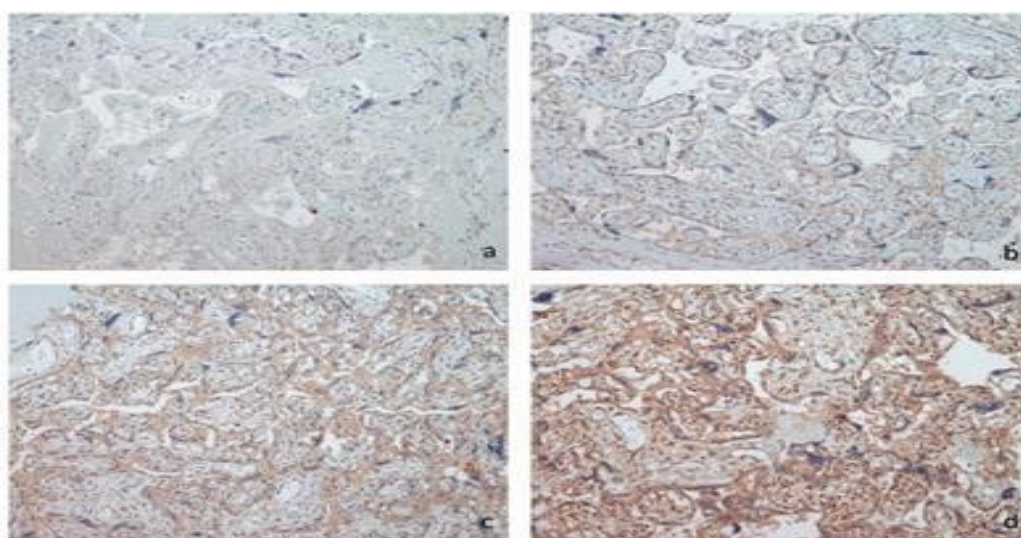
Tablica 11. Leven test usporedbe kategorijalnih obilježja s obzirom na imunohistokemijski indeks bojenja za Ptch1 (tjedni trudnoće, UZV1= biparijetalni promjera; UZV2=dužina bedrene kosti; UZV3=opseg trbuha; Fp=fetoplacentarni omjer; težina ploda,  $\beta$ hCG=humani koronski gonadotropin; PAPP-A=plazmatski protein trudnoće A) između ispitanica sa nižim IIB (0) i višim IIB (1)

| IIB – patched1     |         |    |                     |                       |                 |
|--------------------|---------|----|---------------------|-----------------------|-----------------|
|                    | Doppler | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Sig. (2-tailed) |
| Dob                | 0       | 63 | 34.48               | 5.37                  | .465            |
|                    | 1       | 88 | 35.15               | 5.68                  |                 |
| Uzv1               | 0       | 28 | 90.86               | 3.18                  | .172            |
|                    | 1       | 51 | 89.00               | 6.71                  |                 |
| Uzv2               | 0       | 28 | 70.29               | 4.52                  | .227            |
|                    | 1       | 51 | 68.61               | 6.46                  |                 |
| Uzv3               | 0       | 28 | 310.43              | 15.97                 | .073            |
|                    | 1       | 51 | 300.49              | 26.36                 |                 |
| Težina ploda       | 0       | 63 | 2939.52             | 541.08                | .000            |
|                    | 1       | 90 | 2589.56             | 369.75                |                 |
| Fp omjer           | 0       | 39 | 344.56              | 70.52                 | .492            |
|                    | 1       | 82 | 355.29              | 84.06                 |                 |
| $\beta$ hCG (IU/L) | 0       | 8  | 34.49               | 14.90                 | .532            |
|                    | 1       | 26 | 39.98               | 23.03                 |                 |
| $\beta$ hCG (MoM)  | 0       | 8  | 0.96                | 0.38                  | .356            |
|                    | 1       | 26 | 1.19                | 0.65                  |                 |
| PAPP-A (mIU/L)     | 0       | 8  | 2546.13             | 1076.03               | .803            |
|                    | 1       | 26 | 2700.33             | 1620.05               |                 |
| PAPP-A (MoM)       | 0       | 8  | 1.00                | 0.65                  | .650            |
|                    | 1       | 26 | 1.11                | 0.56                  |                 |



Slika 5. Grafički prikaz vrijednosti imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na težinu ploda (0=viši IIB,1=niži IIB)

U ovom istraživanju smo tkivo posteljice imunohistokemijski obojili na anti-Pached protutijela te ekspresiju proteina Ptch1 očitavali mjerenjem intenziteta obojenja. Ekspresiju Ptch1 smo našli u citoplazmi stanica posteljica sa zastojem fetalnog rasta. Rezultati su prikazani na Slici 6.



Slika 6. Tkivo posteljice nakon imunohistokemijskog označavanja anti-Patched protutijelom (citoplazmatsko obojenje), povećanje 10x: a. negativno obojenje, b. obojenje intenziteta 1, c. obojenje intenziteta 2, d. obojenje intenziteta 3.

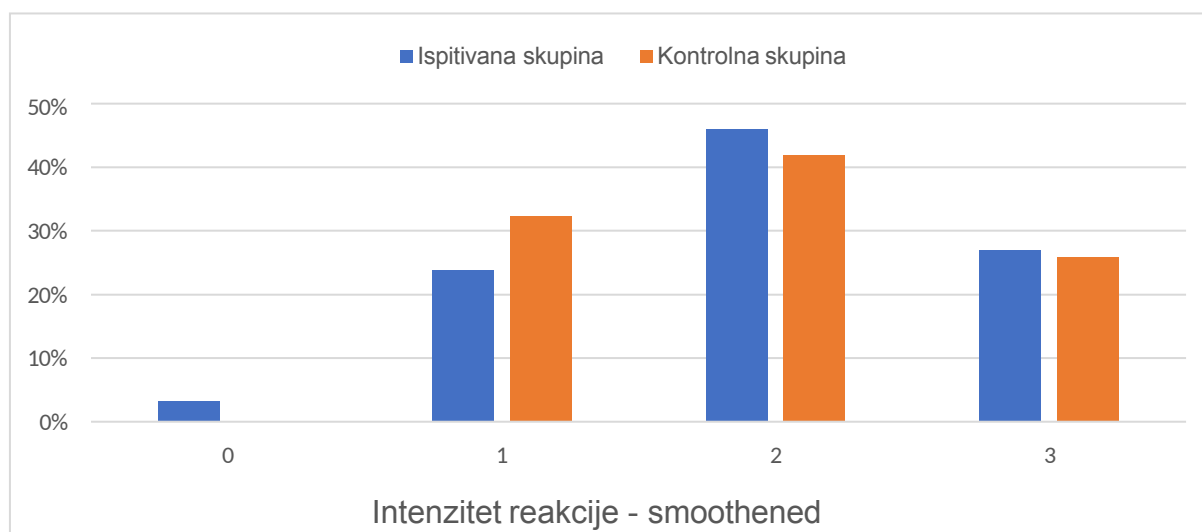


#### 4.2 Ekspresija proteina Smo u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolama

U ovom istraživanju uspoređena je ekspresija proteina Smo u terminskim posteljicama sa zastojem fetalnog rasta (n=122) s njegovom ekspresijom u posteljicama iz urednih trudnoća (n=37). Ekspresija Smo proteina je određena prema intenzitetu stanične reakcije (IR) u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća. U ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta najzastupljeniji je bio intenzitet reakcije 2 koji je zapažen u pedeset i šest posteljica (45.9%), dok je u kontrolnoj skupini najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 2 i to u trinaest posteljica (41.9%). Rezultati su prikazani u Tablici 12 i na Slici 7.

Tablica 12. Intenzitet stanične reakcije za Smo u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća (IR=intenzitet reakcije, 0=bez vidljive reakcije, 1=slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije, 3=jak intenzitet reakcije)

| Intenzitet reakcije – Smo | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|---------------------------|--------------------|-------------------|
| 0                         | 3 (3.3%)           | 0 (0%)            |
| 1                         | 29 (23.8%)         | 10 (32.3%)        |
| 2                         | 56 (45.9%)         | 13 (41.9%)        |
| 3                         | 33 (27%)           | 8 (25.8%)         |



Slika 7. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za Smo u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

S obzirom na manji broj posteljica s IR za Smo u skupinama 0 i 3 sve uzorke smo sveli na dvije skupine iz čega proizilazi da je u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je evidentiran u osamdeset i devet posteljica (73%). U kontrolnoj skupini također je najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je zapažen u dvadeset i jednoj posteljici (67.7%). Rezultati su prikazani u Tablici 13.

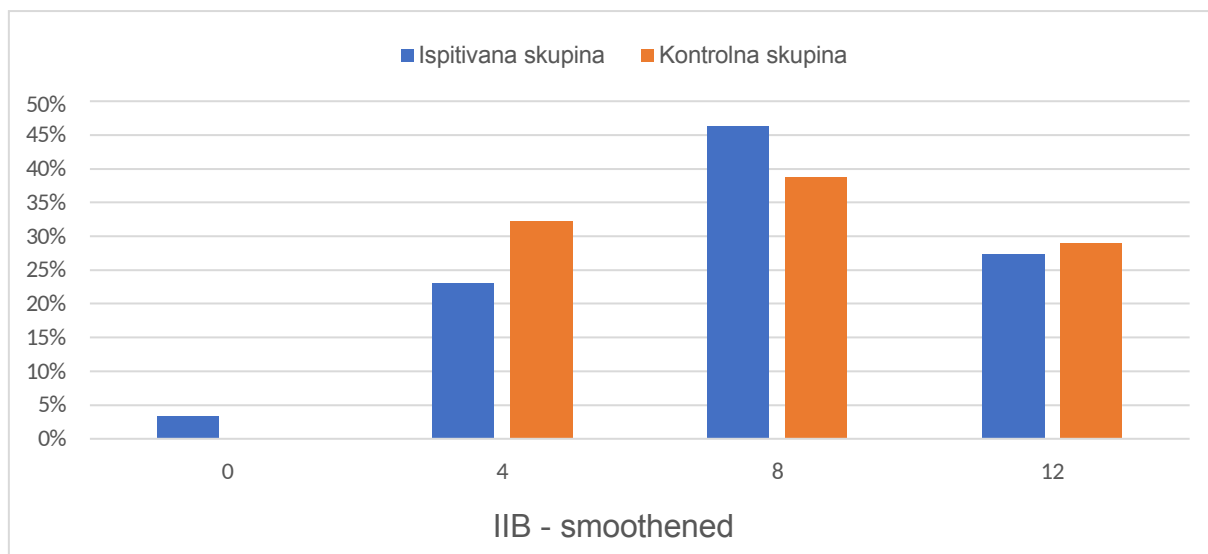
Tablica 13. Intenzitet stanične reakcije za Smo u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća (1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

| Intenzitet reakcije - Smo | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|---------------------------|--------------------|-------------------|
| 0,1=1                     | 33 (27%)           | 10 (32.3%)        |
| 2,3=2                     | 89 (73%)           | 21 (67.7%)        |

Ekspresiju proteina Smo iskazana je putem imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) i prema njegovoj vrijednosti ekspresija je podijeljena u 4 skupine. U ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta kao i u kontrolnoj skupini najviše je bio zastupljen IIB u skupini 8 koji je evidentiran u pedeset i šest posteljica (46.3%) iz trudnoća sa zastojem fetalnog rasta i dvanaest posteljica iz urednih trudnoća (38.7%). Rezultati su prikazani u Tablici 14 i na Slici 8.

Tablica 14. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za Smo: 0-1 (nema reakcije), 2-3 (slabo izražen indeks bojanja), 4-8 (umjereno izražen indeks bojanja), 9-12 (jako izražen indeks bojanja)

| IIB – Smo | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|-----------|--------------------|-------------------|
| 0         | 4 (3.3%)           | 0 (0%)            |
| 4         | 28 (23.1%)         | 10 (32.3%)        |
| 8         | 56 (46.3%)         | 12 (38.7%)        |
| 12        | 33 (27.3%)         | 9 (29%)           |



Slika 8. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Smo u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

S obzirom na manji broj IIB za Smo u skupinama 0 i 12 sve uzorci su svedeni na dvije grupe iz čega proizilazi da je u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta najviše bio zastupljen indeks bojanja 8 koji je evidentiran u osamdeset i devet posteljica (73.6%). Također je i u kontrolnoj skupini najviše bio zastupljen indeks bojanja grupe 8 koji je izmjereno u dvadeset i jednoj posteljici (67.7%). Rezultati su prikazani u Tablici 15.

Tablica 15. Imunohistokemijski indeks bojanja za Smo u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama (4= slabo izražen indeks bojanja, 8= jak intenzitet bojanja)

| IIB – Smo | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|-----------|--------------------|-------------------|
| 0,4=4     | 32 (26.4%)         | 10 (77.4%)        |
| 8,12=8    | 89 (73.6%)         | 21 (67.7%)        |

U ovom istraživanju nije utvrđena značajna statistička razlika u ekspresiji Smo između posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnih posteljica iz urednih trudnoća s obzirom na

intenzitet reakcije stanica ( $p=0.565$ , Hi-kvadrat) i imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) ( $p=0.724$ , Hi-kvadrat test). Rezultati su prikazani u Tablici 16.

Tablica 16. Hi-kvadrat korelacijski test usporedbe intenziteta reakcije i imunohistokemijskog indeksa bojanja za Smo u skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

|                           |            |       |
|---------------------------|------------|-------|
| Intenzitet reakcije – Smo | Hi-kvadrat | 0.332 |
|                           | df         | 1.000 |
|                           | Sig        | 0.565 |
| IIB – Smo                 | Hi-kvadrat | 0.646 |
|                           | df         | 2.000 |
|                           | Sig        | 0.724 |

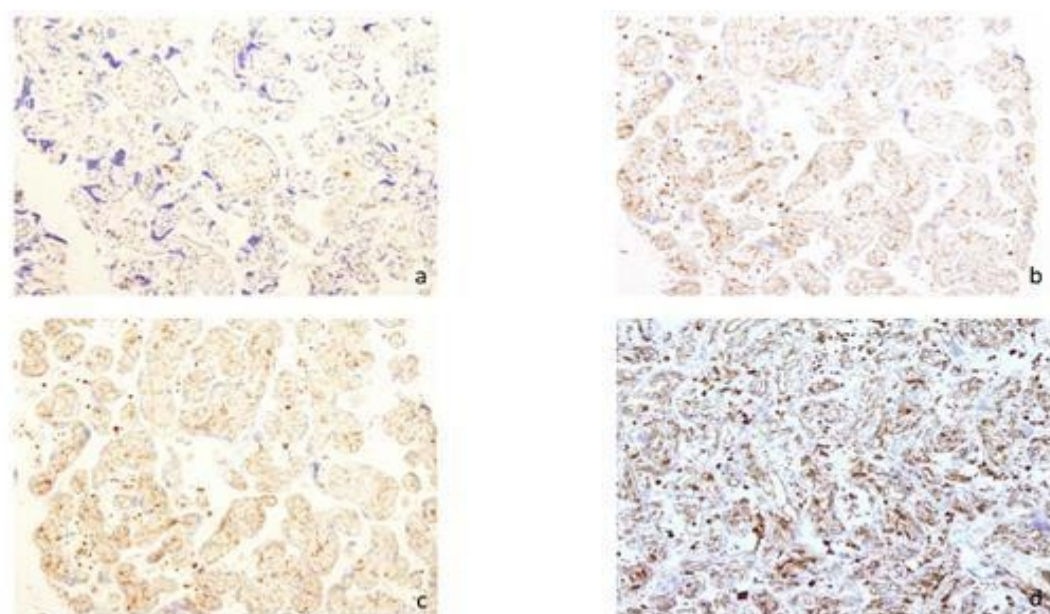
Nadalje nije utvrđena značajna statistička razlika u praćenim kategorijalnim obilježjima između skupina s višim (IIB=8) odnosno nižim (IIB=4) vrijednostima imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Smo mjerenih Levene korelacijskim testom usporedbe. Rezultati su prikazani u Tablici 17.

Tablica 17. Levene test usporedbe kategorijalnih obilježja s obzirom na imunohistokemijski indeks bojanja za Smo (tjedni trudnoće, UZV1= biparijetalni promjera; UZV2=dužina bedrene kosti; UZV3=opseg trbuha; Fp=fetoplacentarni omjer; težina ploda,  $\beta$ hCG=humani koronski gonadotropin; PAPP-A=plazmatski protein trudnoće A) između ispitanica s nižim (IIB=4) i višim (IIB=8) imunohistokemijskim indeksom.

| IIB – smoothened |   |     |                     |                       |                 |
|------------------|---|-----|---------------------|-----------------------|-----------------|
|                  |   | N   | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Sig. (2-tailed) |
| Dob              | 0 | 41  | 34.34               | 5.48                  | .463            |
|                  | 1 | 109 | 35.09               | 5.60                  |                 |
| UZV1             | 0 | 20  | 90.65               | 3.66                  | .370            |
|                  | 1 | 58  | 89.29               | 6.36                  |                 |
| UZV2             | 0 | 20  | 69.50               | 4.45                  | .780            |
|                  | 1 | 58  | 69.07               | 6.36                  |                 |
| UZV3             | 0 | 20  | 303.60              | 19.47                 | .942            |
|                  | 1 | 58  | 304.05              | 25.19                 |                 |
| Težina ploda     | 0 | 42  | 2754.52             | 502.06                | .763            |

|                    |   |     |         |         |      |
|--------------------|---|-----|---------|---------|------|
|                    | 1 | 110 | 2728.09 | 473.44  |      |
| Fp omjer           | 0 | 32  | 347.66  | 78.33   | .733 |
|                    | 1 | 88  | 353.34  | 81.19   |      |
| $\beta$ hCG (IU/L) | 0 | 9   | 43.46   | 28.16   | .442 |
|                    | 1 | 25  | 36.97   | 18.69   |      |
| $\beta$ hCG (MoM)  | 0 | 9   | 1.24    | 0.81    | .546 |
|                    | 1 | 25  | 1.10    | 0.52    |      |
| PAPP-A (mIU/L)     | 0 | 9   | 2506.84 | 1188.28 | .719 |
|                    | 1 | 25  | 2720.64 | 1610.72 |      |
| PAPP-A (MoM)       | 0 | 9   | 1.12    | 0.70    | .829 |
|                    | 1 | 25  | 1.07    | 0.53    |      |

U ovom istraživanju tkivo posteljice je imunohistokemijski obojeno na anti-Smoothened protutijela a ekspresija proteina Smo je očitavana mjerenjem intenziteta obojenja. Ekspresija Smo smo je zabilježena u citoplazmi stanica posteljica sa zastojem fetalnog rasta. Rezultati su prikazani na Slici 9.



Slika 9. Tkivo posteljice, imunohistokemijski obojeno na anti-smoothened protutijelo (citoplazmatsko obojenje), povećanje 10x: a. negativno obojenje, b. obojenje intenziteta 1, c. obojenje intenziteta 2, d. obojenje intenziteta 3.

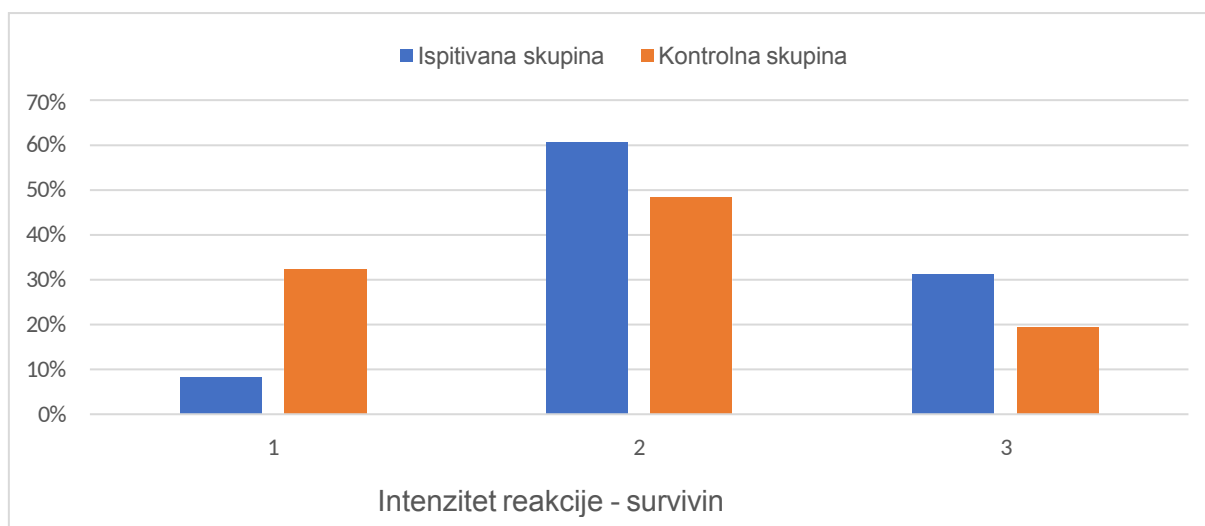
### 4.3 Ekspresija proteina survivin u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolama

U ovom istraživanju uspoređena je ekspresija proteina survivina u terminskim posteljicama sa zastojem fetalnog rasta (n=122) s njegovom ekspresijom u posteljicama iz urednih trudnoća (n=37).

Ekspresija proteina survivina proteina iskazana je i analizirana prema intenzitetu stanične reakcije (IR) u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća. U ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je evidentiran u sedamdeset i četiri posteljice (60.7%). Također je i u kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je zapažen u petnaest posteljica (48.4%). Rezultati su prikazani u Tablici 18 i na Slici 10.

Tablica 18. Intenzitet stanične reakcije za survivin u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća (IR=intenzitet reakcije, 0=bez vidljive reakcije, 1=slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije, 3=jak intenzitet reakcije)

| Intenzitet reakcije - survivin | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|--------------------------------|--------------------|-------------------|
| 1                              | 10 (8.2%)          | 10 (32.3%)        |
| 2                              | 74 (60.7%)         | 15 (48.4%)        |
| 3                              | 38 (31.1%)         | 6 (19.4%)         |

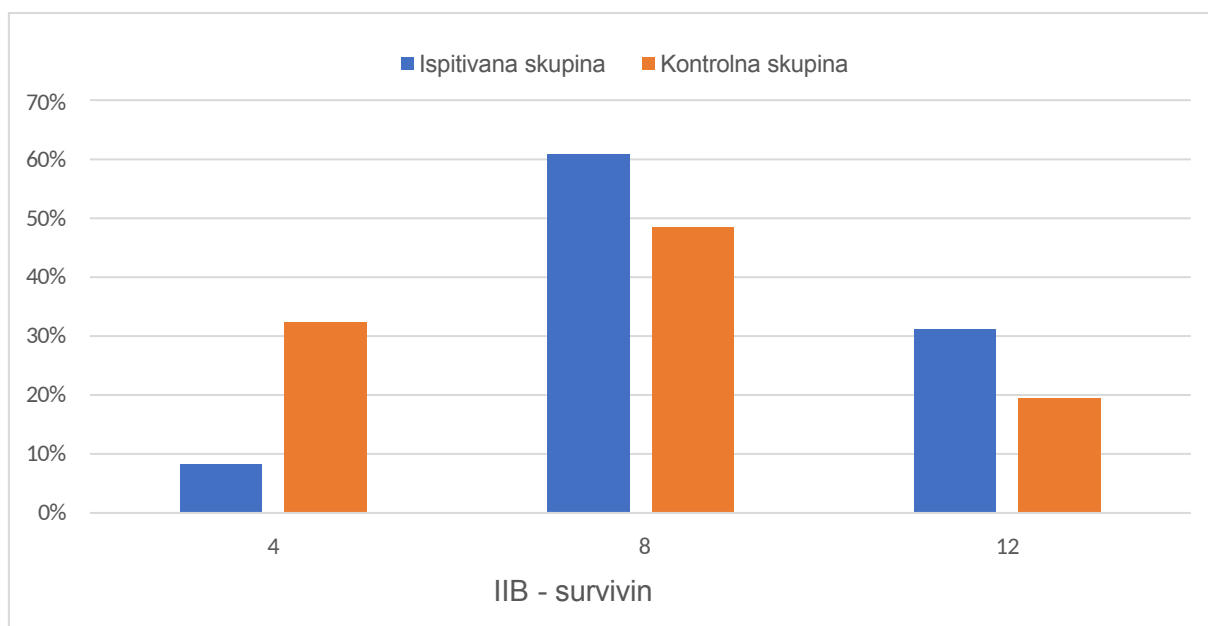


Slika 10. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za survivinu ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Nadalje ekspresija proteina survivina proteina iskazana je putem imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) i prema njegovoj vrijednosti ekspresije podijeljena u 3 skupine. U ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta kao i u kontrolnoj skupini najviše je bio zastupljen IIB u skupini 8 koji je evidentiran u sedamdeset i četiri posteljice (60.7%) iz trudnoća sa zastojem fetalnog rasta i petnaest posteljica iz urednih trudnoća (48.4%). Rezultati su prikazani u Tablici 19 i na Slici 11.

Tablica 19. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za survivin: 4=slabo izražen indeks bojanja, 8= umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja

| IIB - survivin | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|----------------|--------------------|-------------------|
| 4              | 10 (8.2%)          | 10 (32.3%)        |
| 8              | 74 (60.7%)         | 15 (48.4%)        |
| 12             | 38 (31.1%)         | 6 (19.4%)         |



Slika 11. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za survivin u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Rezultati su pokazali da postoji značajna statistička razlika u ekspresiji survivina između posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnih posteljica iz urednim trudnoća s obzirom na intenzitet stanične reakcije ( $p < 0.001$ , Hi.kvadrat test) i imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) ( $p < 0.001$ , Hi-kvadrat test). Rezultati su prikazani u Tablici 20.

Tablica 20. Hi-kvadrat korelacijski test usporedbe intenziteta reakcije i imunohistokemijskog indeksa bojanja za survivin u skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

|                                |            |                                  |
|--------------------------------|------------|----------------------------------|
| Intenzitet reakcije – survivin | Hi-kvadrat | 12.594                           |
|                                | df         | 1.000                            |
|                                | Sig        | <b><math>p &lt; 0.001</math></b> |
| IIB – survivin                 | Hi-kvadrat | 12.783                           |
|                                | df         | 2.000                            |
|                                | Sig        | <b>0.002</b>                     |

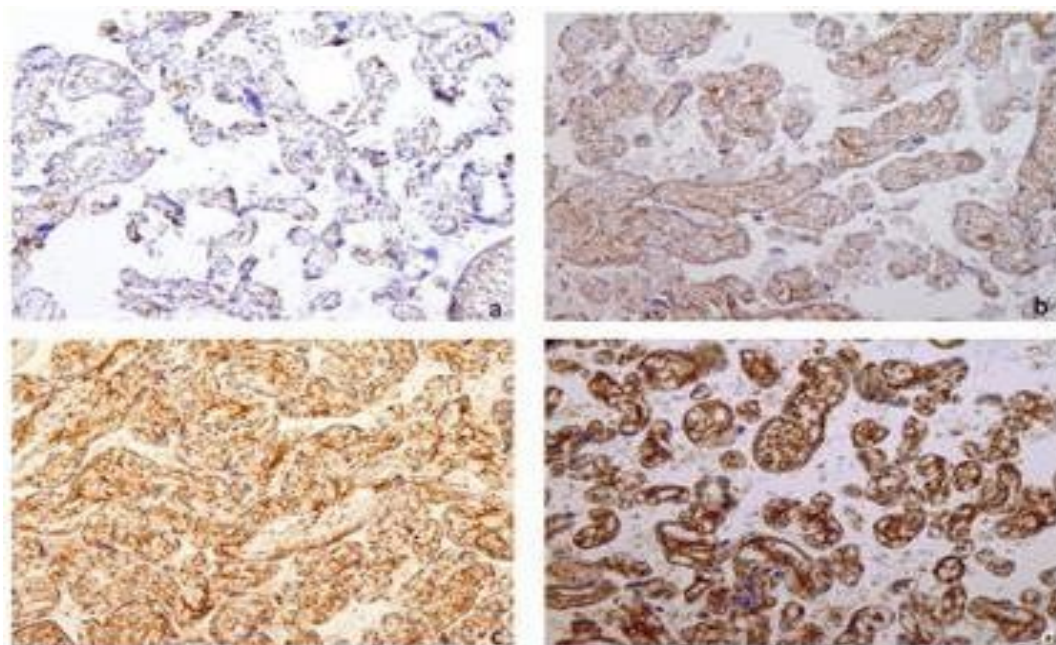


U istraživanju nije utvrđena značajna statistička razlika u promatranim kategorijalnim obilježjima između skupina s višim (IIB=8) odnosno nižim (IIB=4) vrijednostima imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za survivin mjerenih Leven korelacijskim testom usporedbe. Za survivin nisu testirane razlike u  $\beta$ hCG-u i PAPP-A proteinu zbog malog broja ispitanica u skupini markera s nižim vrijednostima. Rezultati su prikazani u Tablici 21.

Tablica 21. Leven test usporedbe kategorijalnih obilježja s obzirom na imunohistokemijski indeks bojenja za survivin (tjedni trudnoće, UZV1= biparijetalni promjera; UZV2=dužina bedrene kosti; UZV3=opseg trbuha; Fp=fetoplacentarni omjer; težina ploda,  $\beta$ hCG=humani koronski gonadotropin; PAPP-A=plazmatski protein trudnoće A) između ispitanica s nižim (IIB=4) i višim (IIB=8) imunohistokemijskim indeksom bojanja

| IIB – survivin     |   |     |                     |                       |                 |
|--------------------|---|-----|---------------------|-----------------------|-----------------|
|                    |   | N   | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Sig. (2-tailed) |
| Dob                | 0 | 20  | 34.10               | 3.67                  | .365            |
|                    | 1 | 131 | 34.98               | 5.78                  |                 |
| UZV1               | 0 | 6   | 88.50               | 4.59                  | .611            |
|                    | 1 | 73  | 89.75               | 5.86                  |                 |
| UZV2               | 0 | 6   | 68.33               | 5.09                  | .709            |
|                    | 1 | 73  | 69.27               | 5.96                  |                 |
| UZV3               | 0 | 6   | 314.50              | 18.63                 | .260            |
|                    | 1 | 73  | 303.15              | 23.86                 |                 |
| Težina ploda       | 0 | 20  | 2954.50             | 570.39                | .070            |
|                    | 1 | 133 | 2700.45             | 456.89                |                 |
| F/p omjer          | 0 | 10  | 344.50              | 54.95                 | .763            |
|                    | 1 | 111 | 352.50              | 81.83                 |                 |
| $\beta$ hCG (IU/L) | 0 | 1   | 23.27               |                       |                 |
|                    | 1 | 33  | 39.15               | 21.48                 |                 |
| $\beta$ hCG (MoM)  | 0 | 1   | 0.94                |                       |                 |
|                    | 1 | 33  | 1.14                | 0.61                  |                 |
| PAPP-A (mIU/L)     | 0 | 1   | 1641.00             |                       |                 |
|                    | 1 | 33  | 2695.05             | 1508.17               |                 |
| PAPP-A (MoM)       | 0 | 1   | 0.56                |                       |                 |
|                    | 1 | 33  | 1.10                | 0.57                  |                 |

U ovom istraživanju tkivo posteljice je imunohistokemijski obojeno na anti-survivin protutijela, a ekspresija proteina survivina je očitavana mjerenjem intenziteta obojenja. Ekspresija survivina zabilježena je u citoplazmi stanica posteljica sa zastojem fetalnog rasta. Rezultati su prikazani na Slici 12.



Slika 12. Tkivo posteljice, imunohistokemijski obojeno na anti-survivin protutijelo (citoplazmatsko obojenje), povećanje 10x: a. negativno obojenje, b. obojenje intenziteta 1, c. obojenje intenziteta 2, d. obojenje intenziteta 3

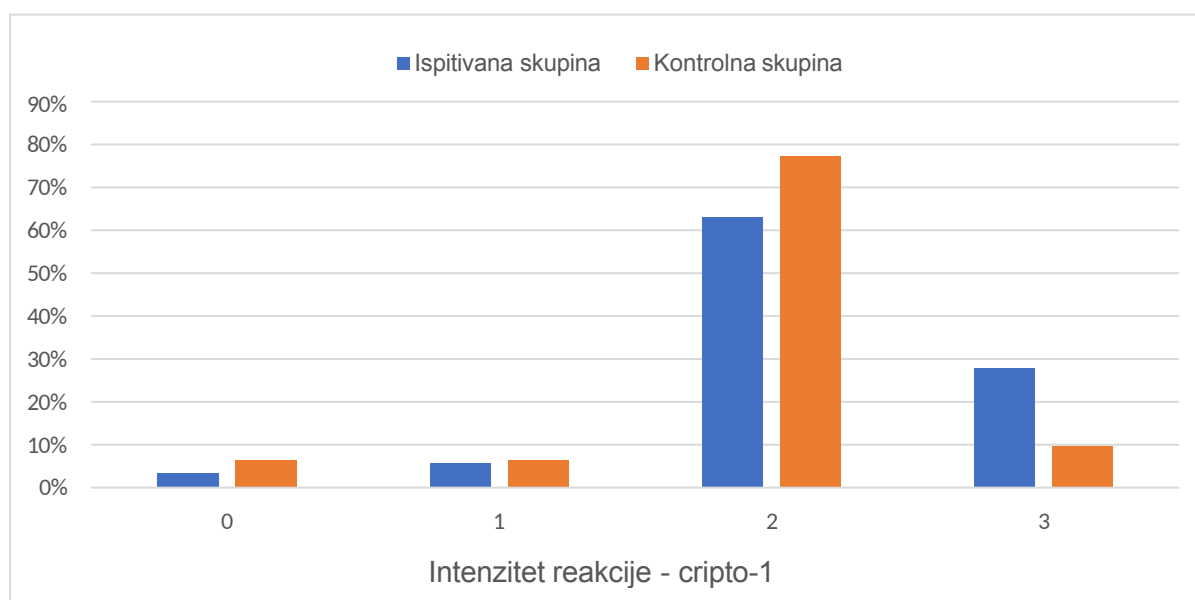
#### **4.4 Ekspresija proteina cripto-1 u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolama**

Uspoređena je ekspresija proteina cripto-1 u terminskim posteljicama sa zastojem fetalnog rasta (n=122) s njegovom ekspresijom u posteljicama iz urednih trudnoća (n=37).

Ekspresiju cripto-1 proteina iskazana je i analizirana prema intenzitetu stanične reakcije (IR) u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća. U ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je evidentiran u sedamdeset i sedam posteljica (63.1%) Također je i u kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je zapažen u dvadeset i četiri posteljice (77.4%). Rezultati su prikazani u Tablici 22 i na Slici 13.

Tablica 22. Intenzitet stanične reakcije za cripto-1 u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća (IR=intenzitet reakcije, 0=bez vidljive reakcije, 1=slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije, 3=jak intenzitet reakcije)

| Intenzitet reakcije – cripto-1 | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|--------------------------------|--------------------|-------------------|
| 0                              | 4 (3.3%)           | 2 (6.5%)          |
| 1                              | 7 (5.7%)           | 2 (6.5%)          |
| 2                              | 77 (63.1%)         | 24 (77.4%)        |
| 3                              | 34 (27.9%)         | 3 (9.7%)          |



Slika 13. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za cripto-1 u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

S obzirom na manji broj IR za cripto-1 u skupinama 0 i 3 uzorci su svedeni na dvije skupine iz čega proizilazi da je u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je evidentiran u sto jedanaest posteljica (91%). U kontrolnoj skupini također je najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je zapažen u dvadeset i sedam posteljica (87.1%). Rezultati su prikazani u Tablici 23.

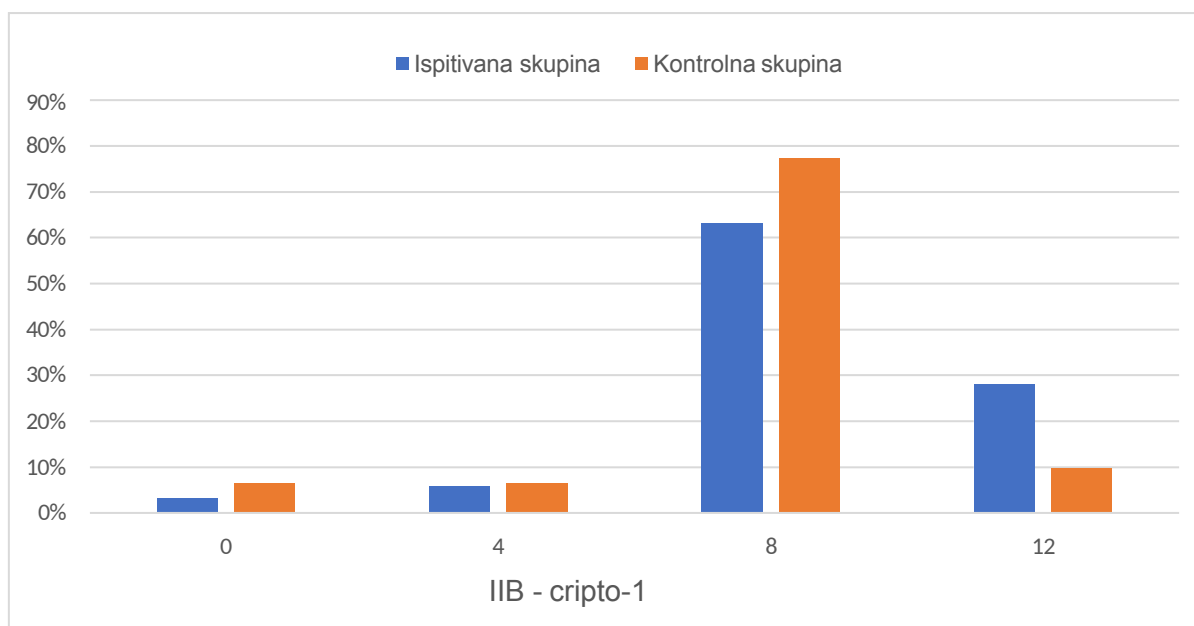
Tablica 23. Intenzitet stanične reakcije za cripto-1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća (1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

| Intenzitet reakcije – cripto-1 | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|--------------------------------|--------------------|-------------------|
| 0,1=1                          | 11 (9%)            | 4 (12.9%)         |
| 2,3=2                          | 111 (91%)          | 27 (87.1%)        |

Ekspresija cripto-1 proteina iskazana je putem imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) i prema njegovoj vrijednosti ekspresija je podijeljena u 4 skupine. U ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta kao i u kontrolnoj skupini najviše je bio zastupljen IIB u skupini 8 koji je evidentiran u sedamdeset i sedam posteljica (63.1%) iz trudnoća sa zastojem fetalnog rasta i dvadeset i četiri posteljice iz urednih trudnoća (77.4%). Rezultati su prikazani u Tablici 24 i na Slici 14.

Tablica 24. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za cripto-1: 0=nema reakcije, 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=ako izražen indeks bojanja

| IIB – cripto-1 | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|----------------|--------------------|-------------------|
| 0              | 4 (3.3%)           | 2 (6.5%)          |
| 4              | 7 (5.7%)           | 2 (6.5%)          |
| 8              | 77 (63.1%)         | 24 (77.4%)        |
| 12             | 34 (27.9%)         | 3 (9.7%)          |



Slika 14. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za crypto-1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

S obzirom na manji broj IIB za crypto-1 u skupinama 0 i 12 svi uzorci su svedeni na dvije skupine iz čega proizilazi da je u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta najviše bio zastupljen indeks bojanja 8 koji je evidentiran u sto jedanest posteljica (91%), U kontrolnoj skupini također je najviše bio zastupljen indeks bojanja grupe 8 koji je izmjereno u dvadeset i sedam posteljica (87.1%). Rezultati su prikazani u Tablici 25.

Tablica 25. Imunohistokemijski indeks bojanja za crypto-1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama (4= slabo izražen indeks bojanja, 8= jak intenzitet bojanja)

| IIB – crypto-1 | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|----------------|--------------------|-------------------|
| 0,4=4          | 11 (9%)            | 4 (12.9%)         |
| 8,12=8         | 111 (91%)          | 27 (87.1%)        |

U ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji crypto-1 između posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnih posteljica iz urednim trudnoća s obzirom na

intenzitet stanične reakcije ( $p=0.516$ , Hi-kvadrat test) i imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) ( $p=0.104$ , Hi-kvadrat test). Rezultati su prikazani u Tablici 26.

Tablica 26. HI-kvadrat korelacijski test usporedbe intenziteta reakcije I imunohistokemijskog indeksa bojanja za cripto-1 u skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

|                                |            |       |
|--------------------------------|------------|-------|
| Intenzitet reakcije – cripto-1 | Hi-kvadrat | 0.422 |
|                                | df         | 1.000 |
|                                | Sig        | 0.516 |
| IIB – cripto-1                 | Hi-kvadrat | 4.530 |
|                                | df         | 2.000 |
|                                | Sig        | 0.104 |

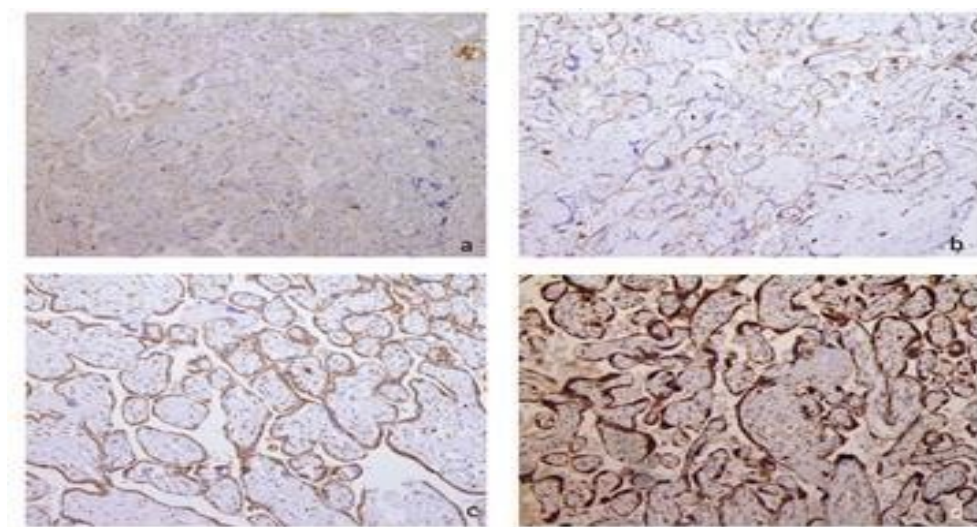
U ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika u promatranim kategorijalnim obilježjima između skupina s višim (IIB=8) odnosno nižim (IIB=4) vrijednostima imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za cripto-1 mjerenih Leven korelacijskim testom usporedbe. Za cripto-1 nisu testirane razlike u  $\beta$ hCG-u i PAPP-A proteinu zbog malog broja ispitanica u skupini markera s nižim vrijednostima. Rezultati su prikazani u Tablici 27.

Tablica 27. Levene test usporedbe kategorijalnih obilježja s obzirom na imunohistokemijski indeks bojenja za cripto-1 (tjedni trudnoće, UZV1= biparijetalni promjera; UZV2=dužina bedrene kosti; UZV3=opseg trbuha; Fp=fetoplacentarni omjer; težina ploda,  $\beta$ hCG=humani koronski gonadotropin; PAPP-A=plazmatski protein trudnoće A) između ispitanica s nižim (IIB=4) i višim (IIB=8) imunohistokemijskim indeksom bojanja

| IIB – cripto-1 |   |     |                     |                       |                 |
|----------------|---|-----|---------------------|-----------------------|-----------------|
|                |   | N   | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Sig. (2-tailed) |
| Dob            | 0 | 15  | 35.47               | 6.12                  | .661            |
|                | 1 | 136 | 34.80               | 5.50                  |                 |
| UZV1           | 0 | 7   | 90.43               | 2.76                  | .713            |
|                | 1 | 72  | 89.58               | 5.98                  |                 |
| UZV2           | 0 | 7   | 69.14               | 4.14                  | .978            |
|                | 1 | 72  | 69.21               | 6.04                  |                 |
| UZV3           | 0 | 7   | 308.57              | 14.55                 | .596            |

|                |   |     |         |         |      |
|----------------|---|-----|---------|---------|------|
|                | 1 | 72  | 303.57  | 24.32   |      |
| Težina ploda   | 0 | 15  | 2659.33 | 476.93  | .529 |
|                | 1 | 138 | 2741.74 | 480.13  |      |
| F/p omjer      | 0 | 11  | 348.45  | 100.32  | .884 |
|                | 1 | 110 | 352.17  | 78.03   |      |
| βhCG (IU/L)    | 0 | 2   | 26.75   | 0.49    |      |
|                | 1 | 32  | 39.43   | 21.78   |      |
| βhCG (MoM)     | 0 | 2   | 0.91    | 0.18    |      |
|                | 1 | 32  | 1.15    | 0.62    |      |
| PAPP-A (mIU/L) | 0 | 2   | 2457.00 | 711.35  |      |
|                | 1 | 32  | 2676.99 | 1537.36 |      |
| PAPP-A (MoM)   | 0 | 2   | 1.12    | 0.47    |      |
|                | 1 | 32  | 1.08    | 0.58    |      |

U ovom istraživanju tkivo posteljice je obojeno imunohistokemijski na anti-cripto-1 protutijela, a ekspresiju proteina cripto-1 očitavana je mjerenjem intenziteta obojenja. Ekspresija cripto-1 zabilježena je u citoplazmi stanica posteljica sa zastojem fetalnog rasta. Rezultati su prikazani na Slici 15.



Slika 15. Tkivo posteljice, imunohistokemijski obojeno na anti-cripto protutijelo (nuklearno i citoplazmatsko obojenje), povećanje 10x: a. negativno obojenje, b. obojenje intenziteta 1, c. obojenje intenziteta 2, d. obojenje intenziteta 3

#### 4.5 Ekspresija proteina Ptch1, Smo, survivina i cripto-1 u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom

Analizirana je ekspresija proteina Ptch1, Smo, survivina i cripto-1 u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom. U ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta preeklampsija je utvrđena u dvadeset sedam ispitanica. U kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama nismo imali preeklampsije. Rezultati su prikazani u Tablici 28.

Tablica 28. Utvrđena preeklampsija u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini (0=bez preeklampsije, 1=s preeklampsijom)

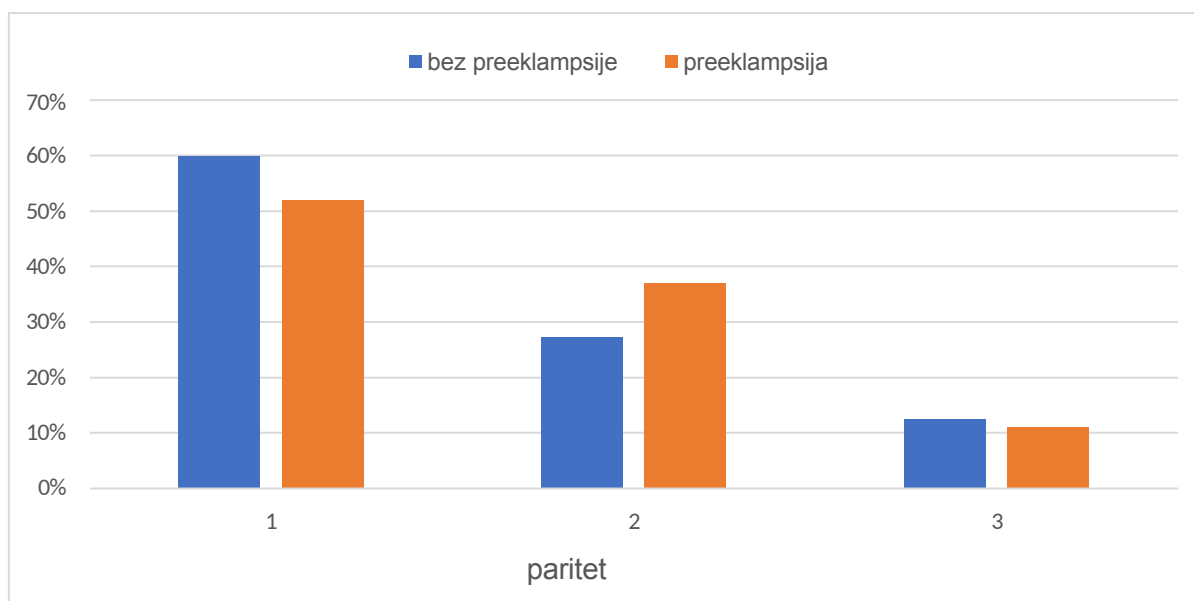
| Preeklampsija | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|---------------|--------------------|-------------------|
| 0             | 95 (77.9%)         | 0 (0%)            |
| 1             | 27 (22.1%)         | 0 (0%)            |

U ispitivanoj skupini s preeklampsijom (n=27) imali smo četrnaest prvorotki (51,9%), deset drugorotki (37%) te tri ispitanica s tri ili više trudnoća (11,1%). U ispitivanoj skupini bez preeklampsije (n=95) imali smo pedeset i sedam prvorotki (60,0%), dvadeset i šest drugorotki (27,4%) i dvanaest ispitanica s tri ili više trudnoća (12,6%). U obje skupine sa zastojem fetalnog rasta najviše je bilo prvorotki. Rezultati su prikazani u Tablici 29 i na Slici 16.

Tablica 29. Prikaz pariteta u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na preeklampsiju (0=bez preeklampsije, 1=s preeklampsijom)

|         |   | Preeklampsija |           |       |           |
|---------|---|---------------|-----------|-------|-----------|
|         |   | 0             |           | 1     |           |
|         |   | Count         | Column N% | Count | Column N% |
| Paritet | 1 | 57            | 60%       | 14    | 51.9%     |
|         | 2 | 26            | 27.4%     | 10    | 37%       |
|         | 3 | 12            | 12.6%     | 3     | 11.1%     |



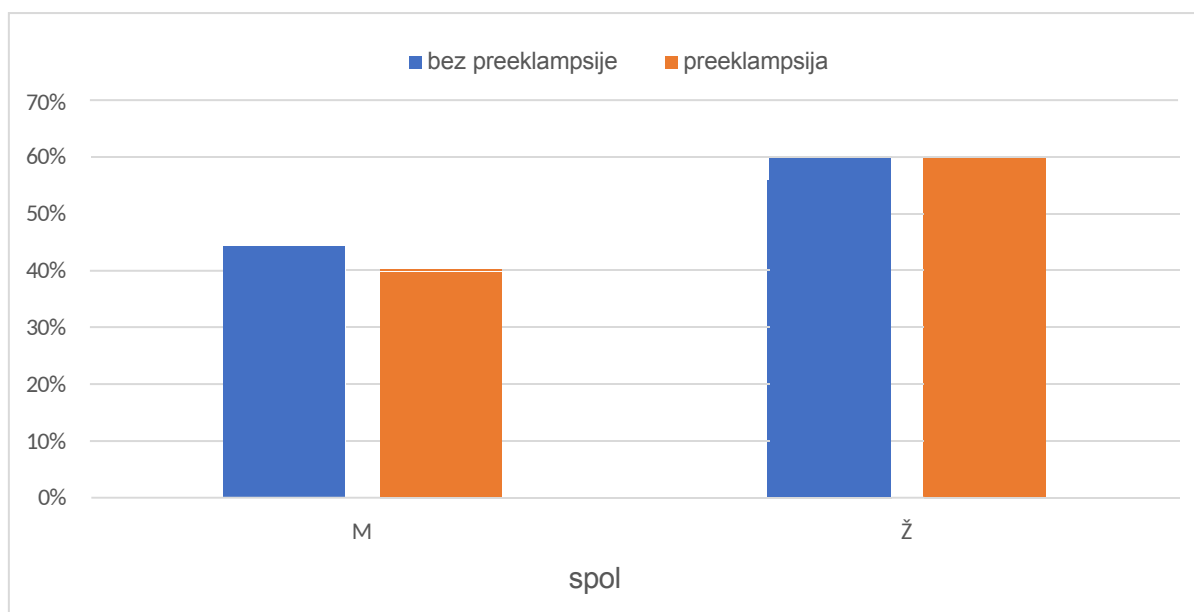


Slika 16. Grafički prikaz pariteta u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na preeklampsiju (1=prvorotke, 2=drugorotke, 3= tri i višerotke)

U odnosu na spol djece u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom imali smo jedanaestero muške (40,7%) i šesnaestero ženske djece (59,3%). U skupini sa zastojem fetalnog rasta bez preeklampsije bila su četrdeset i dva muška djeteta (44,2%) i pedeset i troje ženske djece (55.8%). Rezultate smo prikazali u Tablici 30 i na Slici 17.

Tablica 30. Prikaz raspodjele prema spolu djece u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na prisustvo preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1=s preeklampsijom, M=muški, Ž=ženski)

| Spol | Bez preeklampsije (0) | Preeklampsija (1) |
|------|-----------------------|-------------------|
| M    | 42 (44.2%)            | 11 (40.7%)        |
| Ž    | 53 (55.8%)            | 16 (59.3%)        |

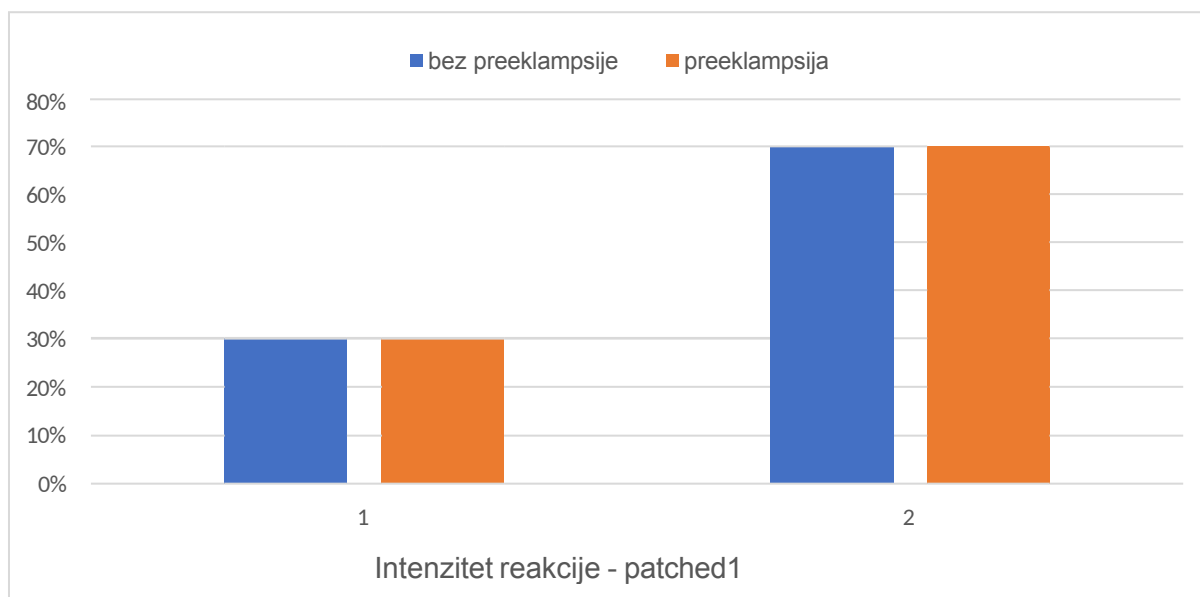


Slika 17. Grafički prikaz raspodjele prema spolu djece u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na prisustvo preeklampsije (M=muški, Ž=ženski)

Ekspresija Ptch1 proteina je analizirana prema intenzitetu stanične reakcije (IR) u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s i bez prisutne preeklampsije. U ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je evidentiran u devetnaest posteljica (70.4%) kao i u skupini sa zastojem fetalnog rasta bez preeklampsije koji je zapažen u šezdeset i pet posteljica (68.4%). Rezultati su prikazani u Tablici 31 i na Slici 18.

Tablica 31. Intenzitet stanične reakcije za Ptch1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije ((0)=bez preeklampsije, (1)=s preeklampsijom, 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

| Intenzitet reakcije – Ptch1 | Bez preeklampsije (0) | Preeklampsija (1) |
|-----------------------------|-----------------------|-------------------|
| 1                           | 30 (31.6%)            | 8 (29.6%)         |
| 2                           | 65 (68.4%)            | 19 (70.4%)        |

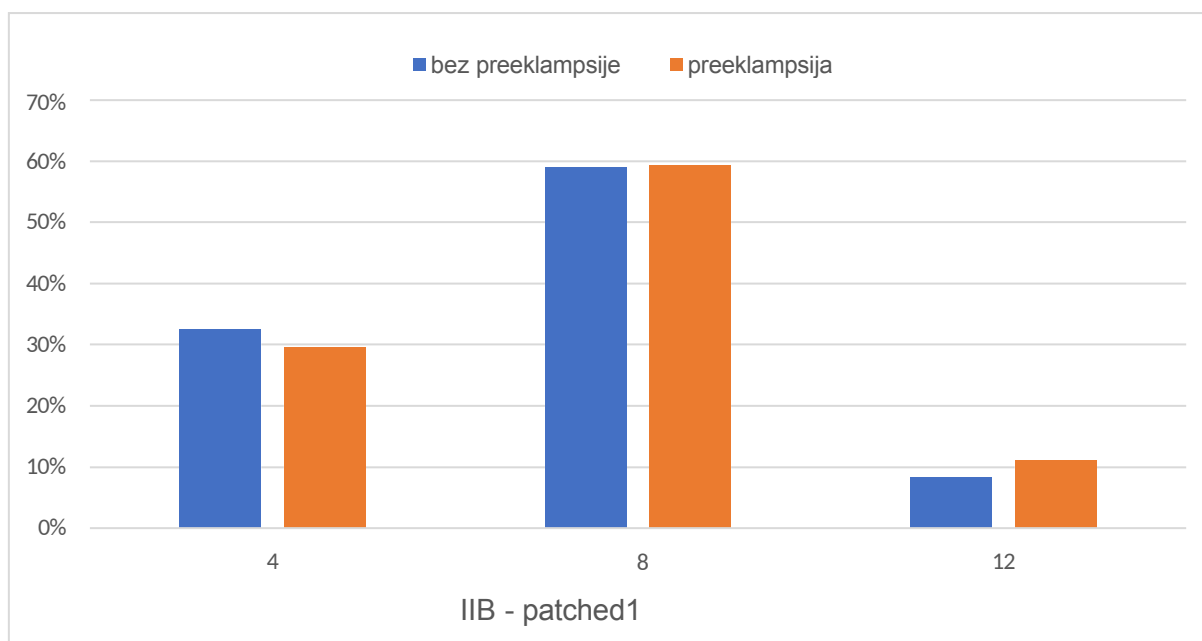


Slika 18. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za Ptch1 u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

Ekspresija Ptch1 proteina iskazana je putem imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) i prema njegovoj vrijednosti ekspresija je podijeljena u 3 skupine. U ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s preeklampsijom najviše je bio zastupljen IIB u skupini 8 koji je evidentiran u šesnaest posteljica (59.3%) isto kao i u skupini ispitanica bez preeklampsije gdje je taj broj posteljica iznosio pedeset i šest (58,9%). Rezultati su prikazani u Tablici 32 i na Slici 19.

Tablica 32. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za Ptch1 u skupini sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije: ((0)=bez preeklampsije, (1)=s preeklampsijom, 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

| IIB – Ptch1 | Bez preeklampsije (0) | Preeklampsija (1) |
|-------------|-----------------------|-------------------|
| 4           | 31 (32.6%)            | 8 (29.6%)         |
| 8           | 56 (58.9%)            | 16 (59.3%)        |
| 12          | 8 (8.4%)              | 13 (11.1%)        |

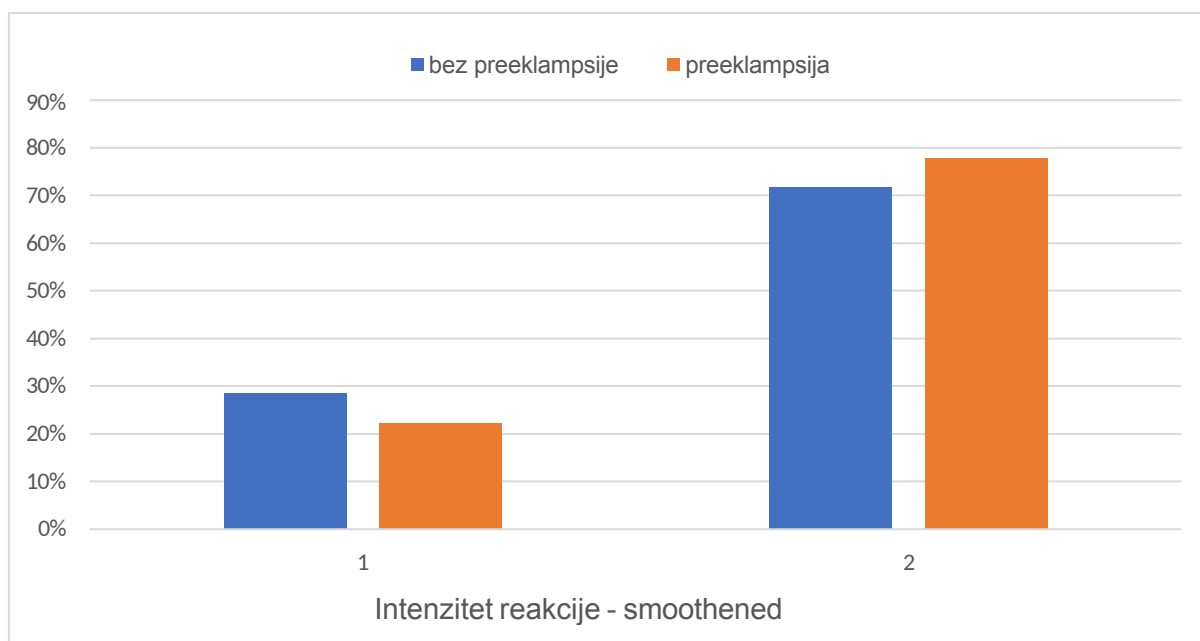


Slika 19. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1 u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

Zatim je analizirana ekspresija Smo proteina prema intenzitetu stanične reakcije (IR) u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s i bez prisutne preeklampsije. U ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je evidentiran u dvadeset i jednoj posteljici (77.8%). Također je u skupini sa zastojem fetalnog rasta bez preeklampsije najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je zapažen u šezdeset i osam posteljica (71.6%). Rezultati su prikazani u Tablici 33 i na Slici 20.

Tablica 33. Intenzitet stanične reakcije za Smo u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije ((0)=bez preeklampsije, (1)=s preeklampsijom, 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

| Intenzitet reakcije - Smo | Bez preeklampsije (0) | Preeklampsija (1) |
|---------------------------|-----------------------|-------------------|
| 1                         | 27 (28.4%)            | 6 (22.2%)         |
| 2                         | 68 (71.6%)            | 21 (77.8%)        |

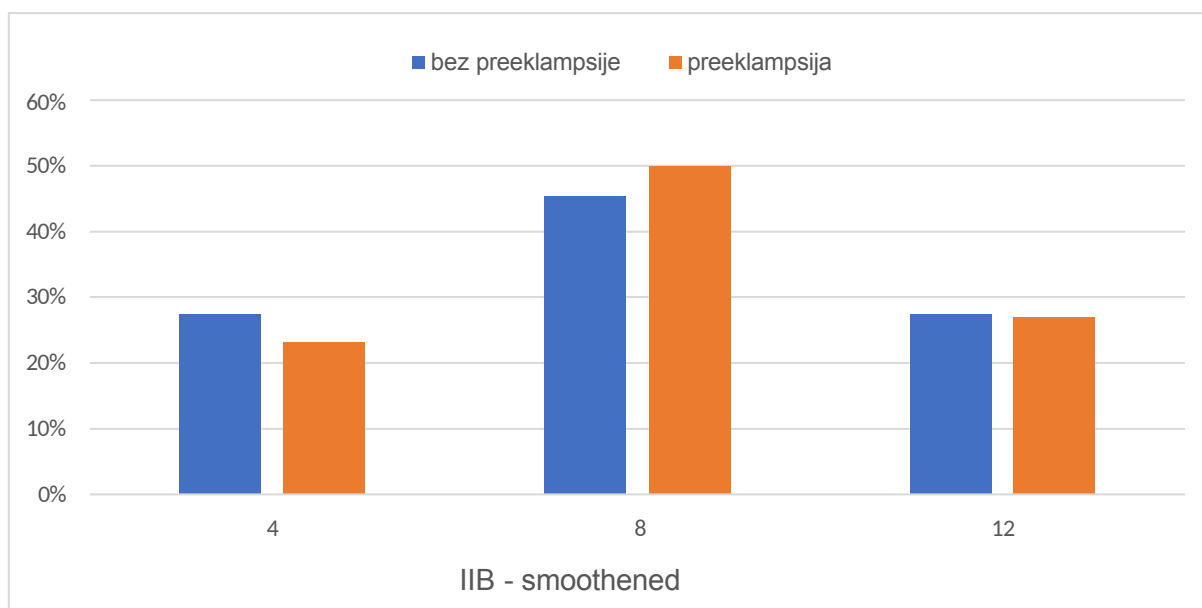


Slika 20. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za Smo u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije ( 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

Ekspresija Smo proteina iskazana je putem imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) i prema njegovoj vrijednosti ekspresija je podijeljena u 3 skupine. U ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s preeklampsijom najviše je bio zastupljen IIB u skupini 8 koji je evidentiran u trinaest posteljica (50,0%) isto kao i u skupini ispitanica bez preeklampsije gdje je taj broj posteljica iznosio četrdeset i tri (45,3%). Rezultati su prikazani u Tablici 34 i Slici 21.

Tablica 34. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za Smo u skupini sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije: ((0)=bez preeklampsije, (1)=s preeklampsijom, 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

| IIB – Smo | Bez preeklampsije (0) | Preeklampsija (1) |
|-----------|-----------------------|-------------------|
| 4         | 26 (27.4%)            | 6 (23.1%)         |
| 8         | 43 (45.3%)            | 13 (50%)          |
| 12        | 26 (27.4%)            | 7 (26.9%)         |

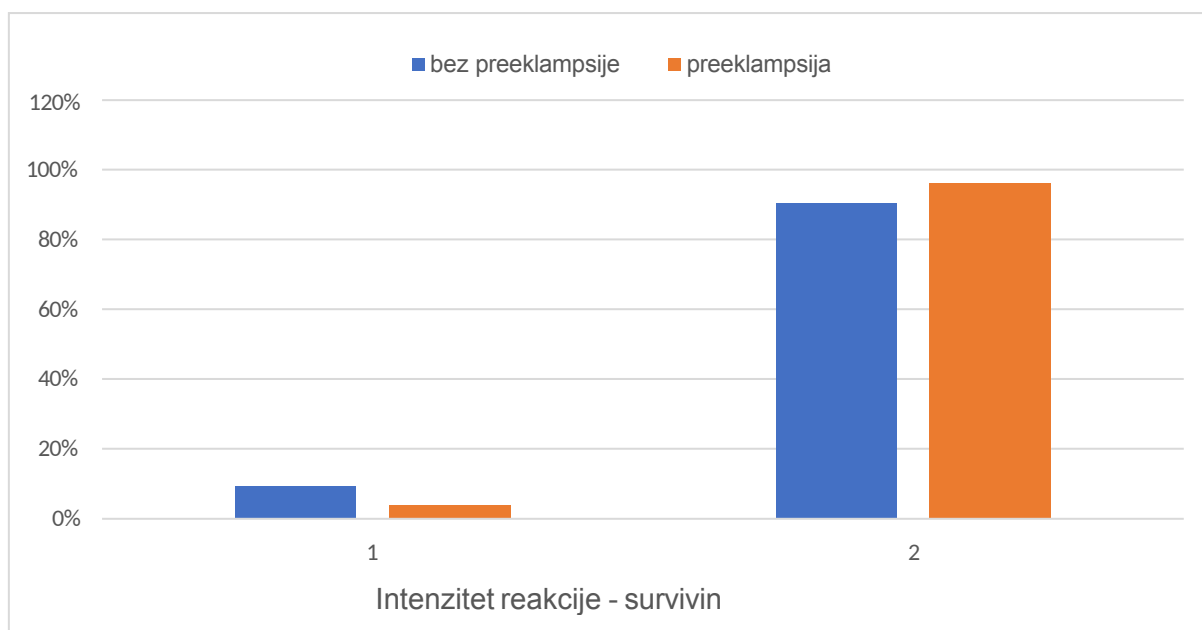


Slika 21. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Smo u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta a i bez preeklampsije (4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

Analizirana je ekspresija survivin proteina prema intenzitetu stanične reakcije (IR) u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s i bez prisutne preeklampsije. U ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je evidentiran u dvadeset i šest posteljica (96.3%). U skupini sa zastojem fetalnog rasta bez preeklampsije isto je najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je zapažen u osamdeset i šest posteljica (90.5%). Rezultati su prikazani u Tablici 35 i na Slici 22.

Tablica 35. Intenzitet stanične reakcije za survivin u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije ((0)=bez preeklampsije, (1)=s preeklampsijom, 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

| Intenzitet reakcije - survivin | Bez preeklampsije (0) | Preeklampsija (1) |
|--------------------------------|-----------------------|-------------------|
| 1                              | 9 (9.5%)              | 1 (3.7%)          |
| 2                              | 86 (90.5%)            | 26 (96.3%)        |

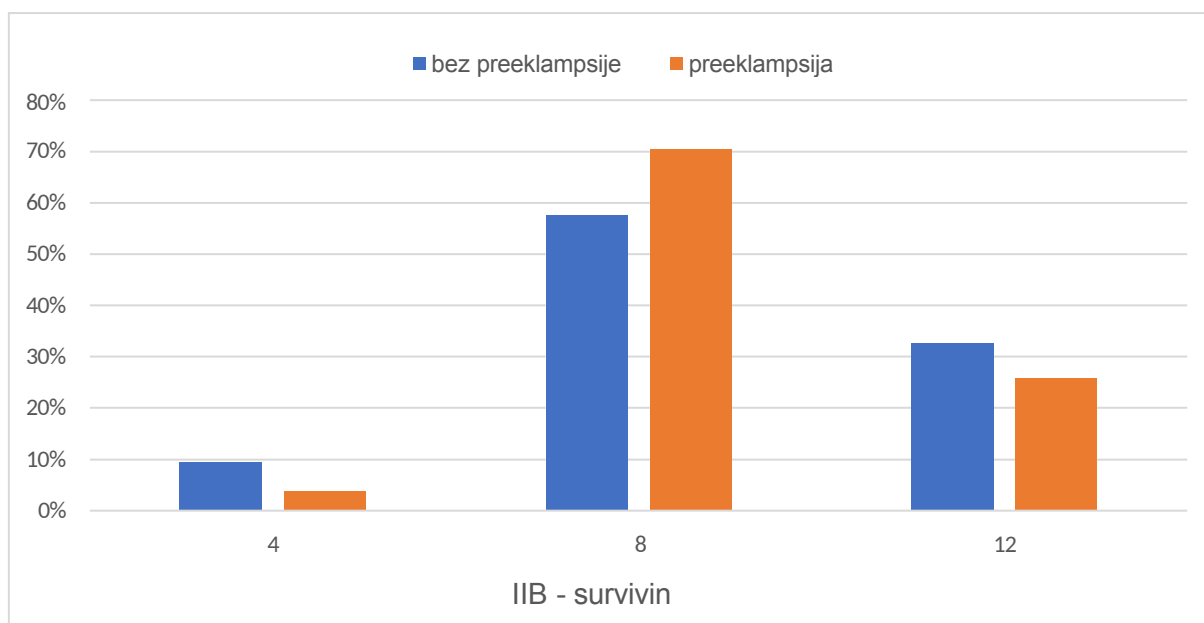


Slika 22. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za survivin u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije ( 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

Ekspresija survivin proteina iskazana je putem imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) i prema njegovoj vrijednosti ekspresija je podijeljena u 3 skupine. U ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s preeklampsijom kao i u skupini bez preeklampsije najviše je bio zastupljen IIB u skupini 8 koji je evidentiran u devetnaest posteljica (70,4%) s preeklampsijom i pedeset i pet posteljica bez preeklampsije (57,6%). Rezultati su prikazani u Tablici 36 i na Slici 23.

Tablica 36. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za survivin u skupini sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije: ((0)=bez preeklampsije, (1)=s preeklampsijom, 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

| IIB – survivin | Bez preeklampsije (0) | Preeklampsija (1) |
|----------------|-----------------------|-------------------|
| 4              | 9 (9.5%)              | 1 (3.7%)          |
| 8              | 55 (57.6%)            | 19 (70.4%)        |
| 12             | 31 (32.6%)            | 7 (25.9%)         |



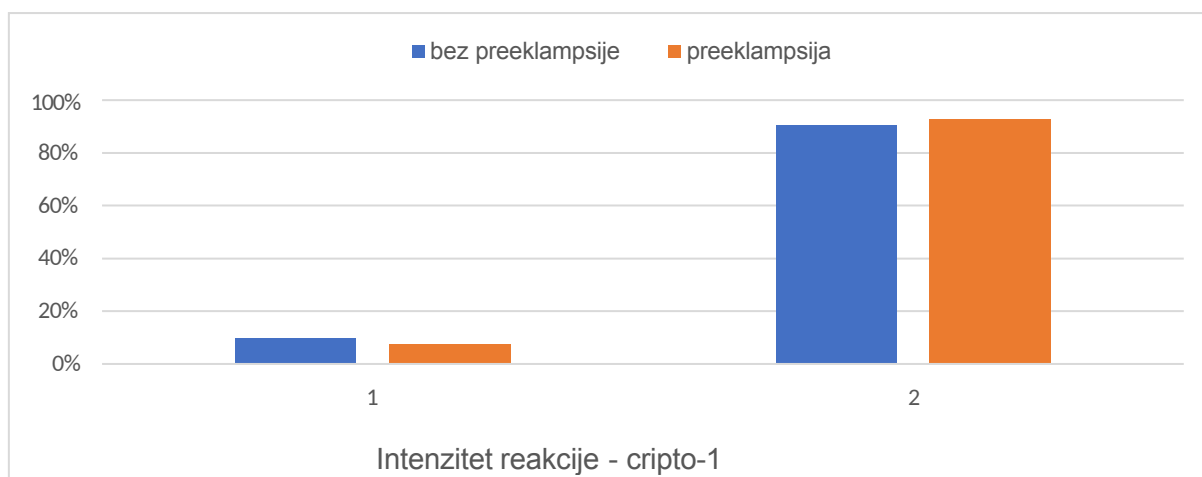
Slika 23. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za survivin u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

Analizirana je ekspresija cripto-1 proteina prema intenzitetu stanične reakcije (IR) u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s i bez prisutne preeklampsije. U ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je evidentiran u dvadeset i pet posteljica (92.6%). Također je i u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta bez preeklampsije najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je zapažen u osamdeset i šest posteljica (90.5%). Rezultati su prikazani u Tablici 37 i na Slici 24.

Tablica 37. Intenzitet stanične reakcije za cripto-1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije ((0)=bez preeklampsije, (1)=s preeklampsijom, 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

| Intenzitet reakcije – cripto-1 | Bez preeklampsije (0) | Preeklampsija (1) |
|--------------------------------|-----------------------|-------------------|
| 1                              | 9 (9.5%)              | 2 (7.4%)          |
| 2                              | 86 (90.5%)            | 25 (92.6%)        |



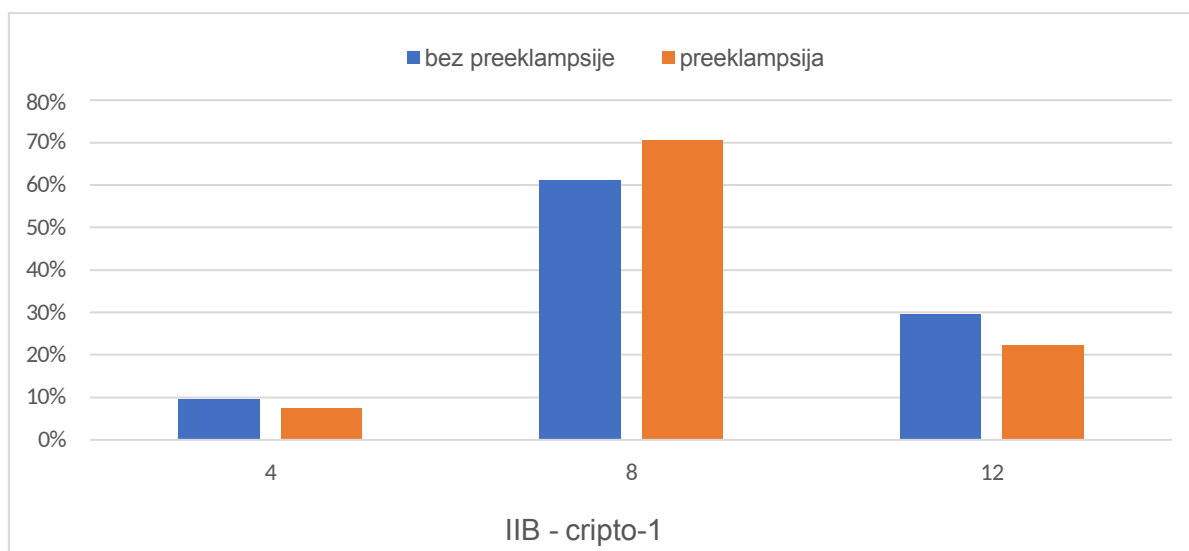


Slika 24. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za survivin u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta sa i bez preeklampsije (1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

Ekspresija cripto-1 proteina iskazana je putem imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) i prema njegovoj vrijednosti ekspresija je podijeljena u 3 skupine. U ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s preeklampsijom kao i u skupini bez preeklampsije najviše je bio zastupljen IIB u skupini 8 koji je evidentiran u devetnaest posteljica (70,4%) s preeklampsijom i pedeset i osam posteljica bez preeklampsije (61,1%). Rezultati su prikazani u Tablici 38 i na Slici 25.

Tablica 38. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za cripto-1 u skupini sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije: ((0)=bez preeklampsije, (1)=s preeklampsijom, 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

| IIB – cripto-1 | Bez preeklampsije (0) | Preeklampsija (1) |
|----------------|-----------------------|-------------------|
| 4              | 9 (9.5%)              | 2 (7.4%)          |
| 8              | 58 (61.1%)            | 19 (70.4%)        |
| 12             | 28 (29.5%)            | 16 (22.2%)        |



Slika 25. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za crypto-1 u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

U ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika u paritetu i spolu između posteljica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na prisutnost preeklampsije. Statistički nije utvrđena ni značajna razlika ekspresije Ptch, Smo, survivina i crypto-1 proteina između posteljica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na prisutnost preeklampsije s obzirom na intenzitet stanične reakcije i imunohistokemijski indeks bojanja izračunati Hi-kvadrat korelacijskim testom usporedbe. Rezultati su prikazani u Tablici 39.

Tablica 39. Hi-kvadrat korelacijski test usporedbe pariteta, spola i ekspresije Ptch1, Smo, survivina i crypto-1 proteina u skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

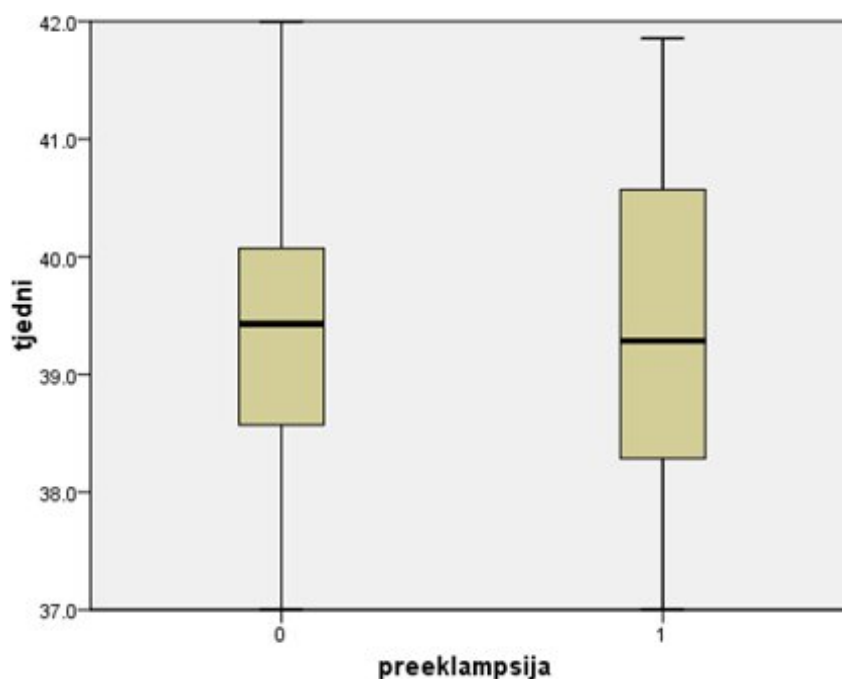
|         |            | Preeklampsija |
|---------|------------|---------------|
| Paritet | Hi-kvadrat | 0.945         |
|         | df         | 2.000         |
|         | Sig        | 0.623         |
| Spol    | Hi-kvadrat | 0.103         |
|         | df         | 1.000         |
|         | Sig        | 0.748         |

|                                |            |       |
|--------------------------------|------------|-------|
| Intenzitet reakcije – Ptch1    | Hi-kvadrat | 0.037 |
|                                | df         | 1.000 |
|                                | Sig        | 0.847 |
| Intenzitet reakcije - Smo      | Hi-kvadrat | 0.409 |
|                                | df         | 1.000 |
|                                | Sig        | 0.522 |
| Intenzitet reakcije - survivin | Hi-kvadrat | 0.930 |
|                                | df         | 1.000 |
|                                | Sig        | .3350 |
| Intenzitet reakcije – cripto-1 | Hi-kvadrat | 0.109 |
|                                | df         | 1.000 |
|                                | Sig        | .7410 |
| IIB – Ptch1                    | Hi-kvadrat | 0.228 |
|                                | df         | 2.000 |
|                                | Sig        | 0.892 |
| IIB – Smo                      | Hi-kvadrat | 0.243 |
|                                | df         | 2.000 |
|                                | Sig        | 0.886 |
| IIB – survivin                 | Hi-kvadrat | 1.697 |
|                                | df         | 2.000 |
|                                | Sig        | 0.428 |
| IIB – cripto-1                 | Hi-kvadrat | 0.785 |
|                                | df         | 2.000 |
|                                | Sig        | 0.675 |

Prosječno trajanje trudnoće u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom je iznosilo trideset i devet tjedana ( $SD \pm 1.14$ ) isto kao i u skupini bez preeklampsije ( $SD \pm 1.37$ ). Rezultati su prikazani u Tablici 40 i na Slici 26.

Tablica 40. Prikaz trajanja trudnoće u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1= s preeklampsijom)

|        | Preeklampsija | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|--------|---------------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| Tjedni | 0             | 95 | 39.356              | 1.1417                | .1171                                   |
|        | 1             | 27 | 39.455              | 1.3743                | .2645                                   |

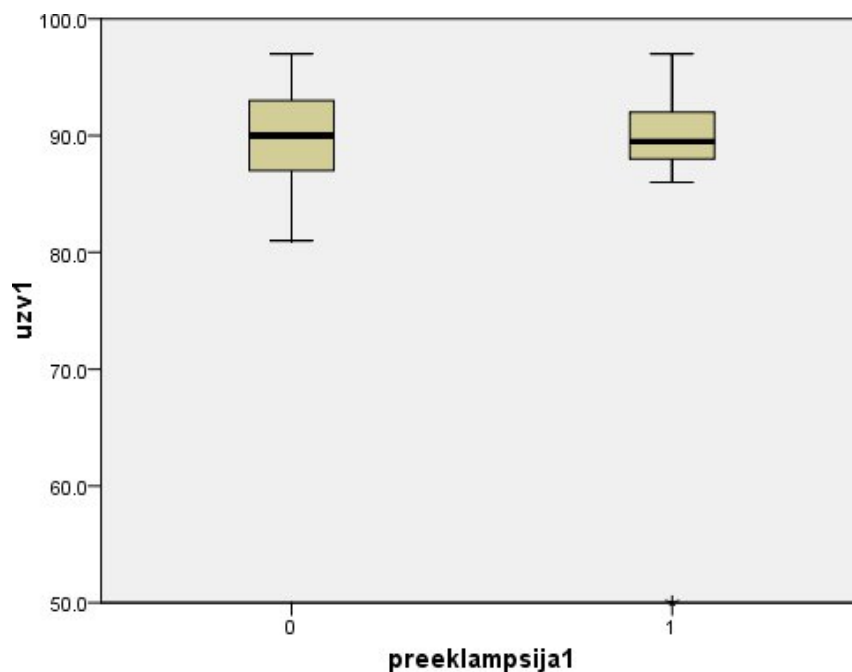


Slika 26. Grafički prikaz trajanja trudnoće u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez (0=bez preeklampsije, 1= s preeklampsijom)

Ultrazvučno mjereni biparijetalni promjer glave fetusa je iznosio prosječno 88.45 mm ( $SD \pm 9.47$ ) u skupini sa zastojem rasta i preeklampsijom, a 90.06 mm ( $SD \pm 3.81$ ) u skupini bez preeklampsije. Rezultati su prikazani u Tablici 41 i na Slici 27.

Tablica 41. Prikaz veličine biparijetalnog promjera glave u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1= s preeklampsijom, ultrazvuk1=biparijetalni promjer glave ploda)

|            | Preeklampsija | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|------------|---------------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| Ultrazvuk1 | 0             | 59 | 90.068              | 3.8141                | .4965                                   |
|            | 1             | 20 | 88.450              | 9.4673                | 2.1169                                  |

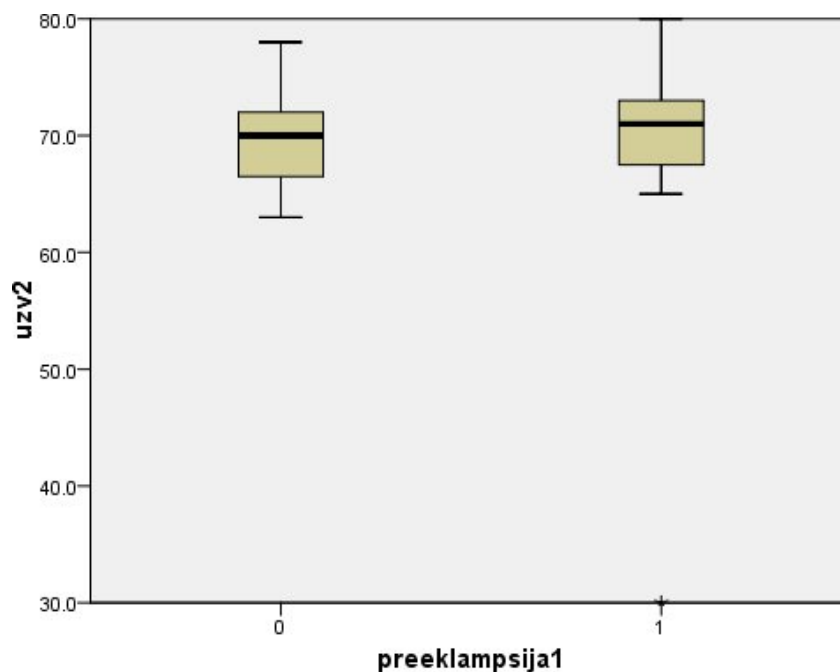


Slika 27. Grafički prikaz veličine biparijetalnog promjera glave ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1= s preeklampsijom)

Ultrazvučno mjerena dužina bedrene kosti ploda je iznosila prosječno 68.7 mm ( $SD \pm 9.83$ ) u skupini sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom, a 69.37 mm ( $SD \pm 3.83$ ) u skupini bez preeklampsije. Rezultati su prikazani u Tablici 42 i na Slici 28.

Tablica 42. Prikaz dužine bedrene kosti ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1= s preeklampsijom, Ultrazvuk2=dužina bedrene kosti ploda)

|            | Preeklampsija | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|------------|---------------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| Ultrazvuk2 | 0             | 59 | 69.373              | 3.8277                | .4983                                   |
|            | 1             | 20 | 68.700              | 9.8253                | 2.1970                                  |

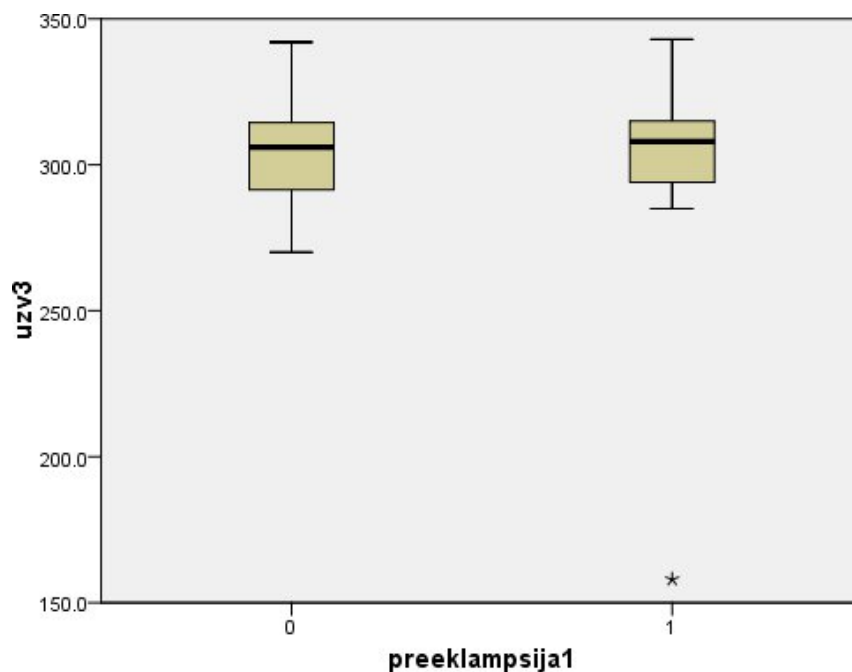


Slika 28. Grafički prikaz dužine bedrene kosti ploda ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1= s preeklampsijom)

U skupini sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom ultrazvučno mjeren opseg trbuha ploda iznosio je prosječno 301.98 mm (SD±17.27), a 301.15 mm (SD±36.92) u skupini bez preeklampsije. Rezultati su prikazani u Tablici 43 i na Slici 29.

Tablica 43. Prikaz opsega trbuha ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1=s preeklampsijom, Ultrazvuk3=opseg abdomena ploda)

|            | Preeklampsija | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|------------|---------------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| Ultrazvuk3 | 0             | 59 | 304.983             | 17.2702               | 2.2484                                  |
|            | 1             | 20 | 301.150             | 36.9242               | 8.2565                                  |

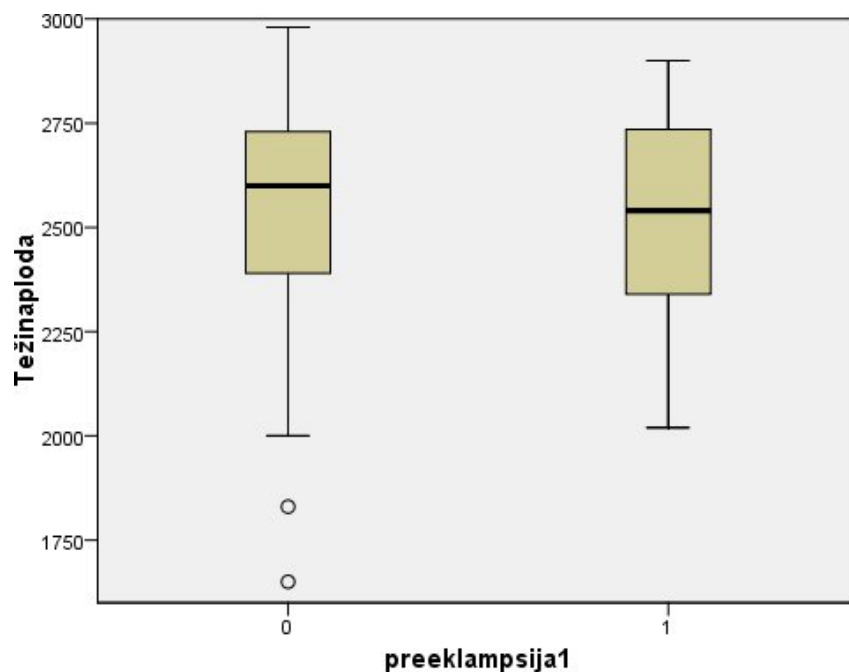


Slika 29. Grafički prikaz opsega trbuha ploda ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1=s preeklampsijom)

Analizirana je prosječna težina ploda u skupini sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom koja je iznosila 2538.52 g ( $SD \pm 250.38$ ), a u skupini bez preeklampsije 2543.26 g ( $SD \pm 258.74$ ). Rezultati su prikazani u Tablici 44 i na Slici 30.

Tablica 44. Prikaz težine ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1=s preeklampsijom)

|              | Preeklampsija | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|--------------|---------------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| Težina ploda | 0             | 95 | 2543.26             | 258.743               | 26.546                                  |
|              | 1             | 27 | 2538.52             | 250.380               | 48.186                                  |



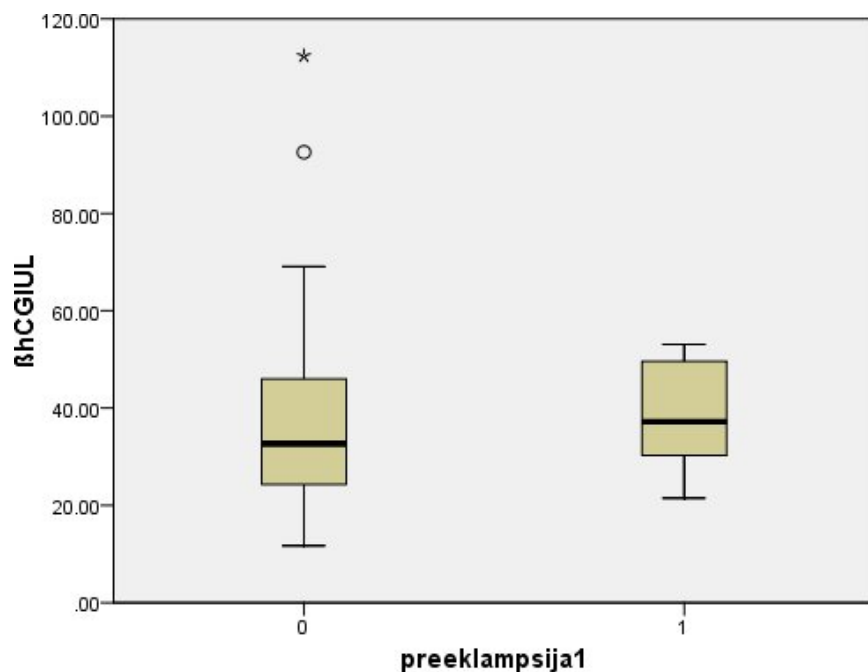
Slika 30. Grafički prikaz težine ploda ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1=s preeklampsijom)

U skupini sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom prosječna vrijednost  $\beta$ hCG-a je iznosila 38.15 IU/L (SD $\pm$ 11.86), a u skupini bez preeklampsije 38.80 IU/L (SD $\pm$ 23.01). Rezultati su prikazani u Tablici 45 i na Slici 31.

Tablica 45. Prikaz vrijednosti  $\beta$ hCG-a (IU/L) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1=s preeklampsijom)

|                    | Preeklampsija | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|--------------------|---------------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| $\beta$ hCG (IU/L) | 0             | 28 | 38.8032             | 23.01260              | 4.34897                                 |
|                    | 1             | 6  | 38.1483             | 11.86138              | 4.84239                                 |



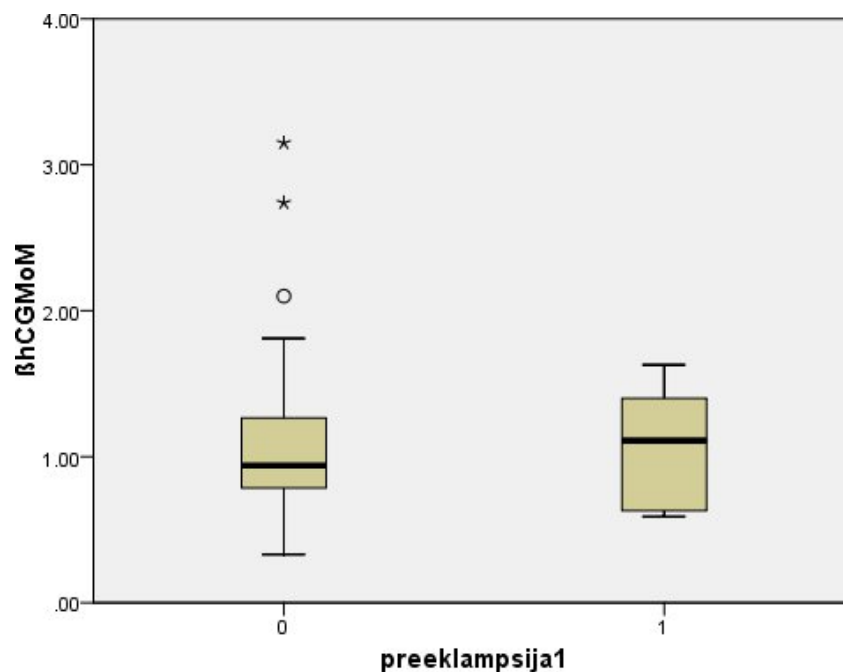


Slika 31. Grafički prikaz vrijednosti  $\beta$ hCG-a (IU/L) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1=s preeklampsijom)

Prosječna vrijednost  $\beta$ hCG-a (MoM) u skupini sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom je iznosila 1.078 MoM ( $SD \pm 0.43$ ), a u skupini bez preeklampsije 1.15 MoM ( $SD \pm 0.63$ ). Rezultati su prikazani u Tablici 46 i na Slici 32.

Tablica 46. Prikaz vrijednosti  $\beta$ hCG-a (MoM) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1= s preeklampsijom)

|                   | Preeklampsija | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|-------------------|---------------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| $\beta$ hCG (MoM) | 0             | 28 | 1.1486              | .63919                | .12080                                  |
|                   | 1             | 6  | 1.0783              | .42930                | .17526                                  |

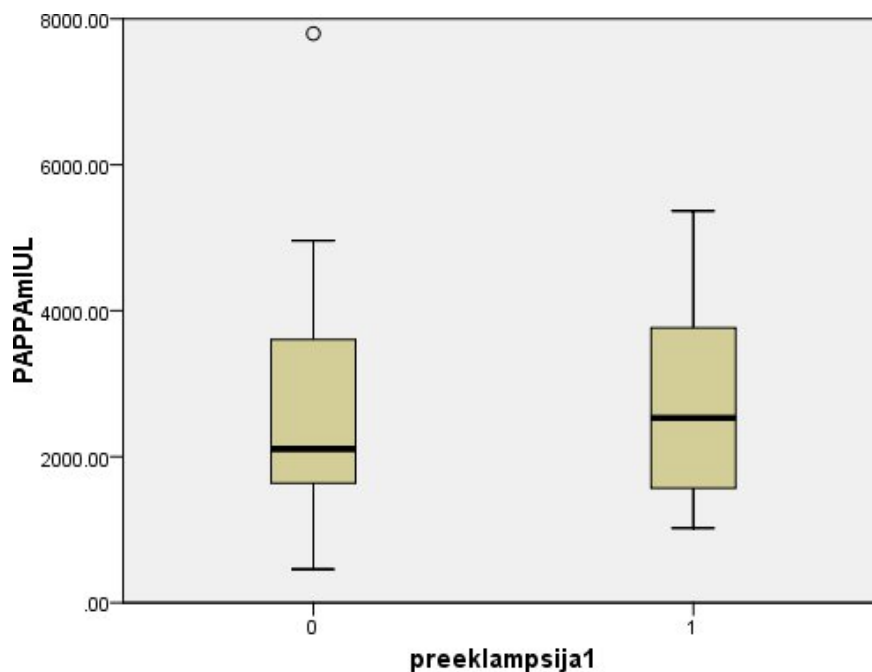


Slika 32. Grafički prikaz vrijednosti  $\beta$ hCG-a (MoM) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1=s preeklampsijom)

U skupini sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom prosječna vrijednost PAPP-A (mIU/L) je iznosila 2798.33 mIU/L (SD $\pm$ 1636.40), a u skupini bez preeklampsije 2635.27 mIU/L (SD $\pm$ 1494.99). Rezultati su prikazani u Tablici 47 i na Slici 33.

Tablica 47. Prikaz vrijednosti PAPP-A (mIU/L) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1=s preeklampsijom)

|                | Preeklampsija | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|----------------|---------------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| PAPP-A (mIU/L) | 0             | 28 | 2635.2714           | 1494.98324            | 282.52528                               |
|                | 1             | 6  | 2798.3333           | 1636.40064            | 668.05777                               |

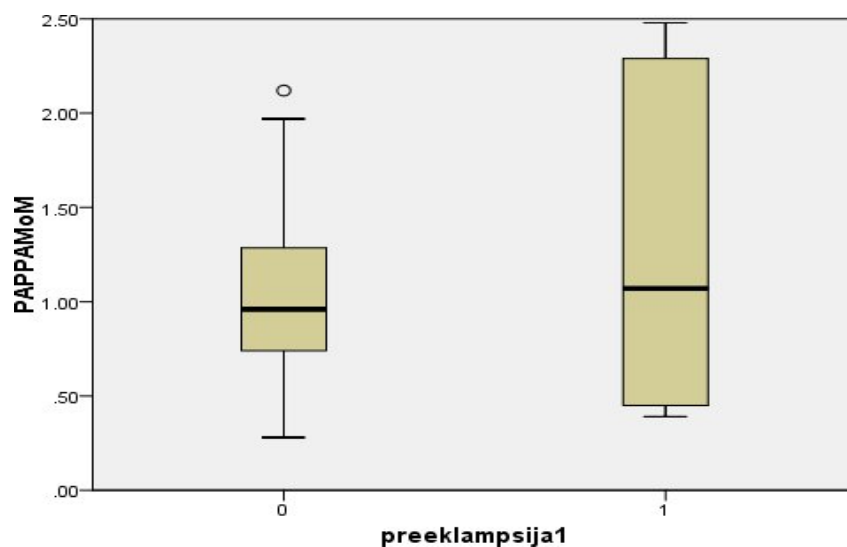


Slika 33. Grafički prikaz vrijednosti PAPP-A (mIU/L) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1=s preeklampsijom)

Prosječna vrijednost PAPP-A (MoM) u skupini sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom je iznosila 1.291 MoM ( $SD \pm 0.9026$ ), a u skupini bez preeklampsije 1.035 MoM ( $SD \pm 0.485$ ). Rezultati su prikazani u Tablici 48 i na Slici 34.

Tablica 48. Prikaz vrijednosti PAPP-A (MoM) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1=s preeklampsijom)

|              | Preeklampsija | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|--------------|---------------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| PAPP-A (MoM) | 0             | 28 | 1.0354              | .48515                | .09168                                  |
|              | 1             | 6  | 1.2917              | .90261                | .36849                                  |



Slika 34. Grafički prikaz vrijednosti PAPP-A (MoM) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije (0=bez preeklampsije, 1=s preeklampsijom)

U ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika u promatranim kategorijalnim obilježjima ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na prisutnost preeklampsije mjerenih Levene korelacijskim testom usporedbe. Rezultati su prikazani u Tablici 49.

Tablica 49. Levene korelacijski test usporedbe kategorijalnih obilježja (tjedni trudnoće, UZV1= biparijetalni promjera; UZV2=dužina bedrene kosti; UZV3=opseg trbuha; Fp=fetoplacentarni omjer; težina ploda, βhCG=humani koronski gonadotropin; PAPP-A=plazmatski protein trudnoće A) između ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

| Independent Samples Test |                                        |             |       |
|--------------------------|----------------------------------------|-------------|-------|
|                          |                                        | Levene test | p     |
| Tjedni                   | Pretpostavljene jednake varijance      | .073        | 0.706 |
| UZV1                     | Nisu pretpostavljene jednake varijance | .338        | 0.280 |
| UZV2                     | Nisu pretpostavljene jednake varijance | .097        | 0.661 |

|                |                                        |      |       |
|----------------|----------------------------------------|------|-------|
| UZV3           | Nisu pretpostavljene jednake varijance | .201 | 0.534 |
| Težina ploda   | Nisu pretpostavljene jednake varijance | .995 | 0.933 |
| fp omjer       | Nisu pretpostavljene jednake varijance | .889 | 0.315 |
| βhCG (IU/L)    | Nisu pretpostavljene jednake varijance | .250 | 0.947 |
| βhCG (MoM)     | Nisu pretpostavljene jednake varijance | .654 | 0.800 |
| PAPP-A (mIU/L) | Nisu pretpostavljene jednake varijance | .641 | 0.813 |
| PAPP-A (MoM)   | Nisu pretpostavljene jednake varijance | .020 | 0.526 |

#### 4.6 Ekspresija proteina Ptch1, Smo, survivina i cripto-1 u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i patološkim nalazom Dopplera

Analizirana je ekspresija proteina Ptch1, Smo, survivina i cripto-1 u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s patološkim nalazom Dopplera. U ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta patološki nalaz Dopplera je utvrđen u trideset i sedam ispitanica (46.2%). U kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama nismo imali patološkog nalaza Dopplera. Rezultati su prikazani u Tablici 50.

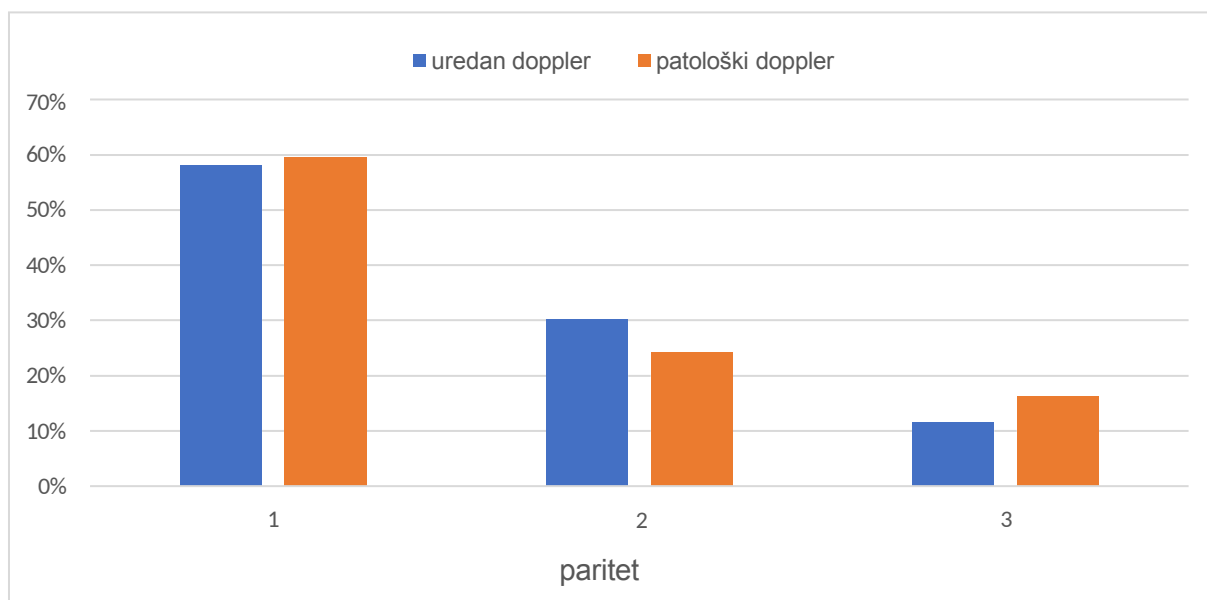
Tablica 50. Prikaz patološkog Dopplera u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini (0=uredan nalaz Dopplera, 1=patološki nalaz Dopplera)

| Doppler | Ispitivana skupina | Kontrolna skupina |
|---------|--------------------|-------------------|
| 0       | 43 (53.8%)         | 0 (0%)            |
| 1       | 37 (46.2%)         | 0 (0%)            |

U ispitivanoj skupini s patološkim Dopplerom (n=37) imali smo dvadeset i dvije prvorotke (59,5%), devet drugorotki (24.3%) te šest ispitanica s tri ili više trudnoća (16,2%). U ispitivanoj skupini s urednim Dopplerom (n=43) bilo je dvadeset i pet prvorotki (58.1%), trinaest drugorotki (30.2%) i pet ispitanica s tri ili više trudnoća (11,6%). U obje skupine sa zastojem fetalnog rasta najviše je bilo prvorotki. Rezultati su prikazani u Tablici 51 i na Slici 35.

Tablica 51. Prikaz pariteta u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na nalaz Dopplera (0=uredan Doppler, 1=patološki Doppler)

|         |   | Doppler |           |       |           |
|---------|---|---------|-----------|-------|-----------|
|         |   | 0       |           | 1     |           |
|         |   | Count   | Column N% | Count | Column N% |
| Paritet | 1 | 25      | 58.1%     | 22    | 59.5%     |
|         | 2 | 13      | 30.2%     | 9     | 24.3%     |
|         | 3 | 5       | 11.6%     | 6     | 16.2%     |

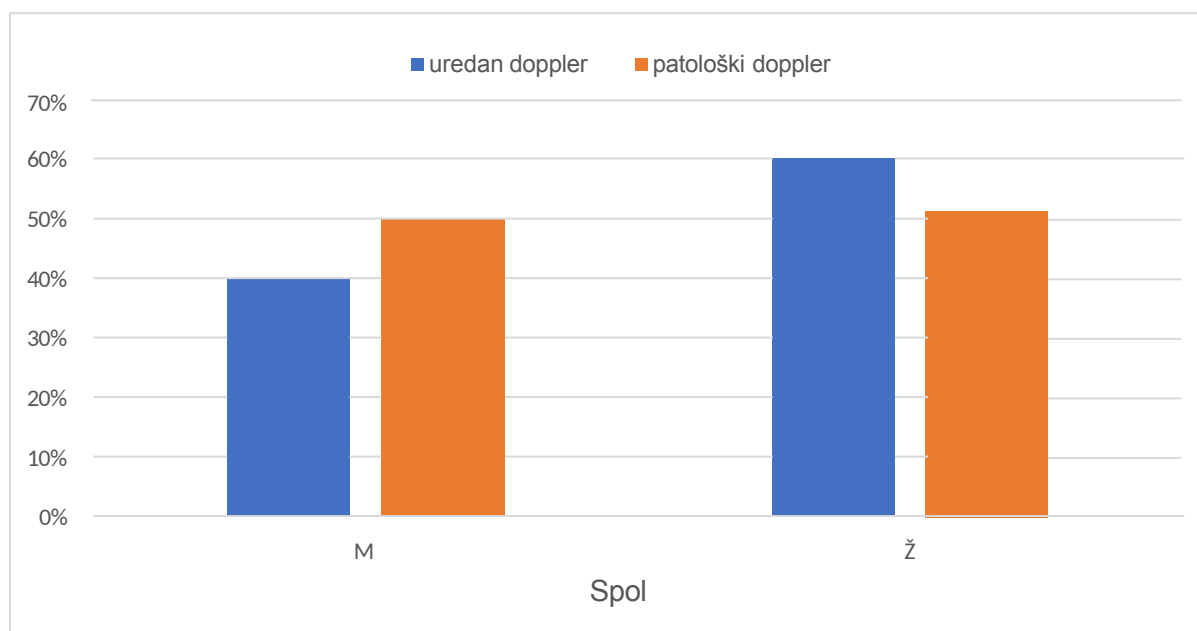


Slika 35. Grafički prikaz pariteta u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na nalaz Dopplera (1=prvorotke, 2=drugorotke, 3= tri i višerotke)

Analizirajući spol djece u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta i patološkim Dopplerom imali smo osamnaestero muške (48.6%) i devetnaestero ženske djece (51.4%), a u skupini sa zastojem fetalnog rasta s urednim Dopplerom sedamnaestero muške (39.5%) i dvadeset i šest ženske djece (60.5%). Rezultati su prikazani u Tablici 52 i na Slici 36.

Tablica 52. Prikaz raspodjele prema spolu djece u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na nalaz Dopplera ((0)=uredan Doppler, 1=patološki Doppler, M=muški, Ž=ženski)

| Spol | Uredan Doppler (0) | Patološki Doppler (1) |
|------|--------------------|-----------------------|
| M    | 17 (39.5%)         | 18 (48.6%)            |
| Ž    | 26 (60.5%)         | 19 (51.4%)            |

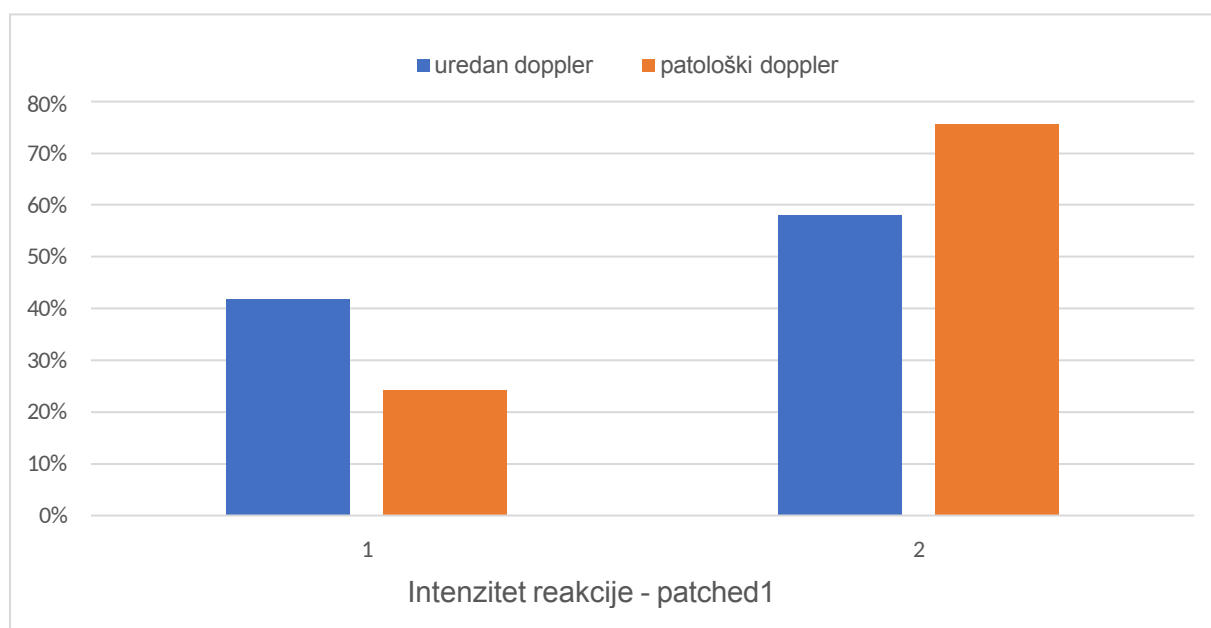


Slika 36. Grafički prikaz raspodjele prema spolu djece u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na nalaz Dopplera (M=muški, Ž=ženski)

Nadalje analizirana je ekspresija Ptch1 proteina prema intenzitetu stanične reakcije (IR) u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim nalazom Dopplera. U ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta i patološkim Dopplerom najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je evidentiran u dvadeset i sedam posteljica (75.7%). U skupini sa zastojem fetalnog rasta i urednim nalazom Dopplera također je najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je zapažen u dvadeset i pet posteljica (58.1%). Rezultati su prikazani u Tablici 53 i na Slici 37.

Tablica 53. Intenzitet stanične reakcije za Ptch1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim dopplerom ((0)=uredan Doppler, (1)=patološki Doppler, 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

| Intenzitet reakcije – patched1 | Uredan Doppler (0) | Patološki Doppler (1) |
|--------------------------------|--------------------|-----------------------|
| 1                              | 18 (41.9%)         | 9 (24.3%)             |
| 2                              | 25 (58.1%)         | 28 (75.7%)            |



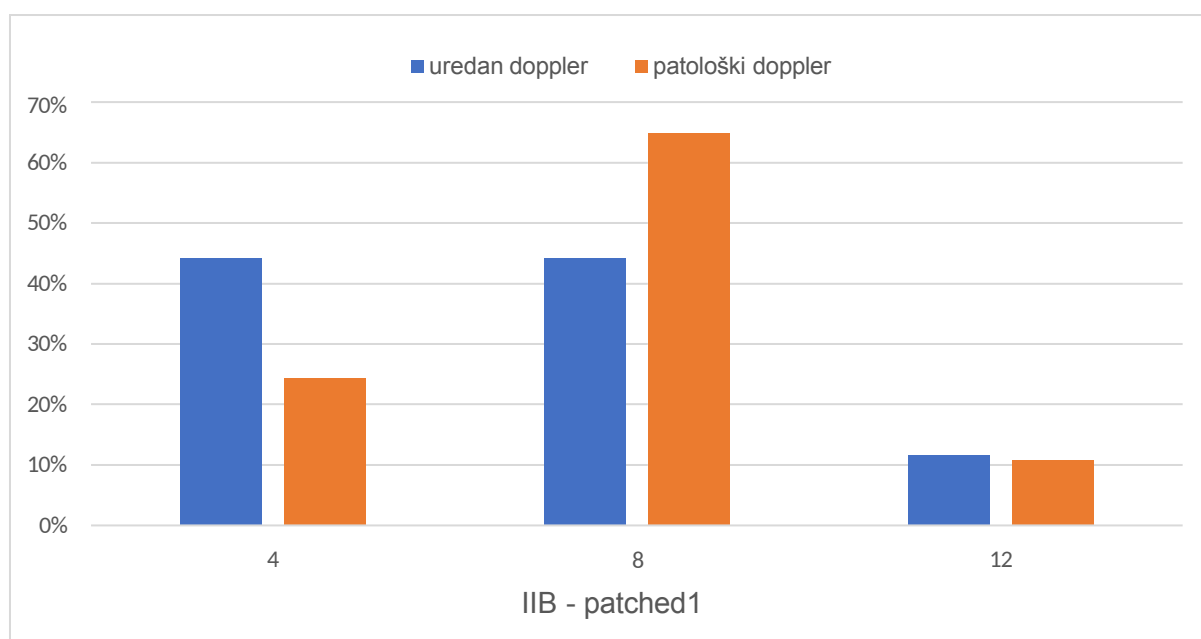
Slika 37. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za Ptch1 u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

Ekspresija Ptch1 proteina iskazana je putem imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) i prema njegovoj vrijednosti ekspresija je podijeljena u 3 skupine. U ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i patološkim nalazom Dopplera najviše je bio zastupljen IIB u skupini 8 koji je evidentiran u dvadeset i četiri posteljice (64.9%) isto kao i u skupini ispitanica s urednim nalazom Dopplera gdje je taj broj posteljica iznosio devetnaest (44.2%). Rezultati su prikazani u Tablici 54 i na Slici 38.



Tablica 54. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za Ptch1 u skupini sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom: ((0)=uredan Doppler, (1)=s-patološki Doppler, 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

| IIB – Ptch1 | Uredan Doppler (0) | Patološki Doppler (1) |
|-------------|--------------------|-----------------------|
| 4           | 19 (44.2%)         | 9 (24.3%)             |
| 8           | 19 (44.2%)         | 24 (64.9%)            |
| 12          | 5 (11.6%)          | 4 (10.8%)             |

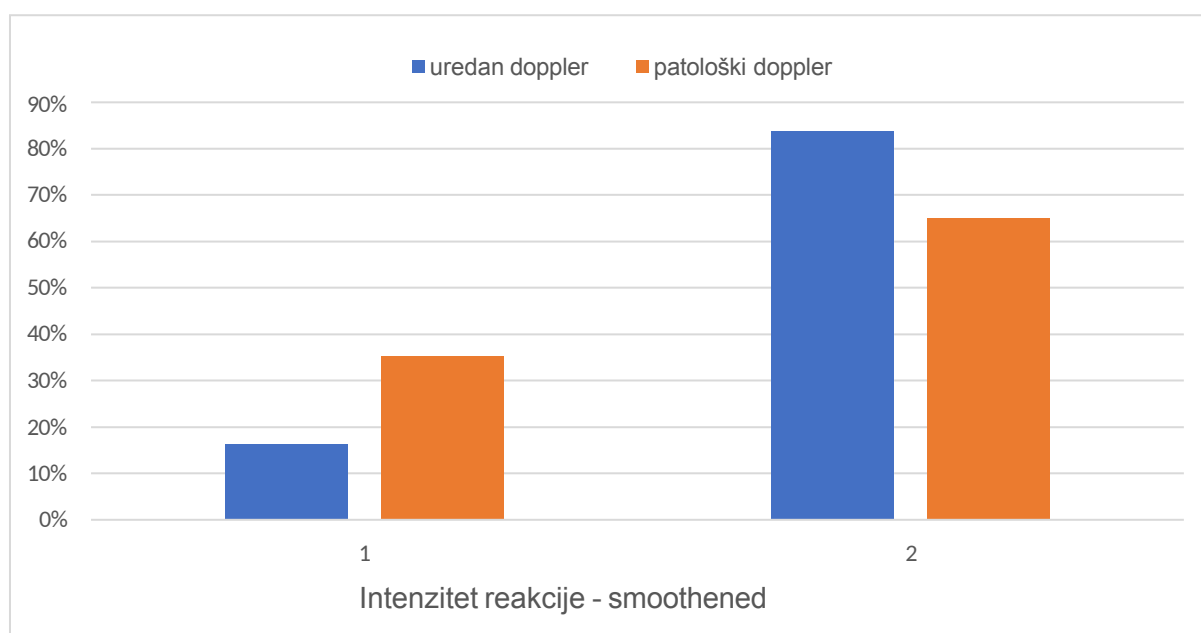


Slika 38. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1 u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

Nadalje analizirana je ekspresija Smo proteina prema intenzitetu stanične reakcije (IR) u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim nalazom Dopplera. U ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta i patološkim Dopplerom najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je evidentiran u dvadeset i četiri posteljice (64.9%). Također je u skupini sa zastojem fetalnog rasta i urednim nalazom Dopplera najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je zapažen u trideset i šest posteljica (83.7%). Rezultati su prikazani u Tablici 55 i na Slici 39.

Tablica 55. Intenzitet stanične reakcije za Smo u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim nalazom Dopplera ((0)=uredan Dopplera, (1)=patološki Doppler, 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

| Intenzitet reakcije – Smo | Uredan Doppler | Patološki Doppler |
|---------------------------|----------------|-------------------|
| 1                         | 7 (16.3%)      | 13 (35.1%)        |
| 2                         | 36 (83.7%)     | 24 (64.9%)        |

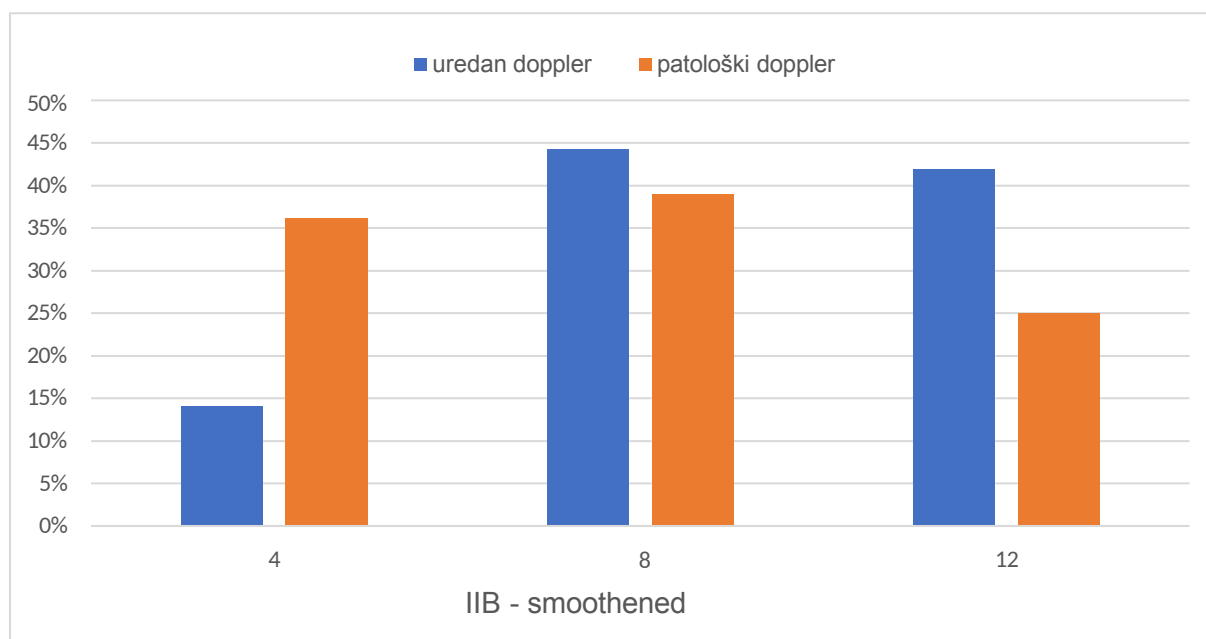


Slika 39. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za Smo u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

Ekspresija Smo proteina iskazana je putem imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) i prema njegovoj vrijednosti ekspresija je podijeljena u 3 skupine. U ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i patološkim nalazom Dopplera najviše je bio zastupljen IIB u skupini 8 koji je evidentiran u četrnaest posteljica (38.9%) isto kao i u skupini ispitanica s urednim Dopplerom gdje je taj broj posteljica iznosio devetnaest (44,2%). Rezultati su prikazani u Tablici 56 i na Slici 40.

Tablica 56. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za Smo u skupini sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom: ((0)=uredan Doppler, (1)=patološki Doppler, 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

| IIB – Smo | Uredan Doppler (0) | Patološki Doppler (1) |
|-----------|--------------------|-----------------------|
| 4         | 6 (14%)            | 13 (36.1%)            |
| 8         | 19 (44.2%)         | 14 (38.9%)            |
| 12        | 18 (41.9%)         | 9 (25%)               |

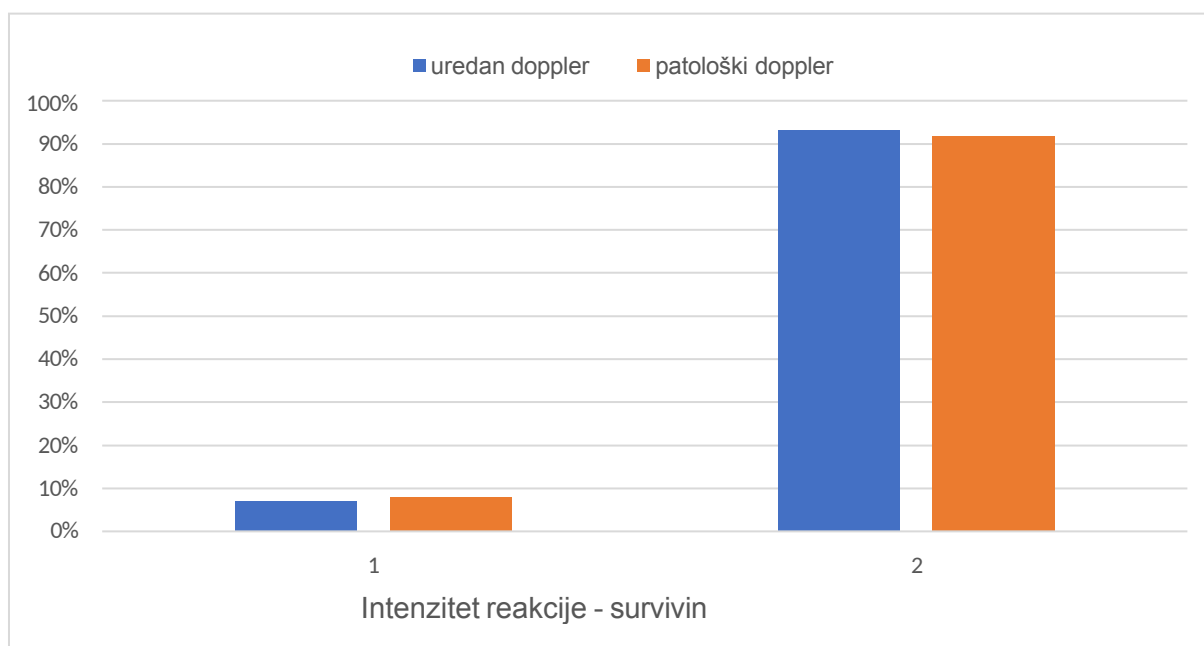


Slika 40. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Smo u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

Analizirana je ekspresija survivin proteina prema intenzitetu stanične reakcije (IR) u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim nalazom Dopplera. U ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta i patološkim Dopplerom najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je evidentiran u trideset i četiri posteljice (91.9%). U skupini sa zastojem fetalnog rasta i urednim Dopplerom također je najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je zapažen u četrdeset posteljica (93%). Rezultati su prikazani u Tablici 57 i na Slici 41.

Tablica 57. Intenzitet stanične reakcije za survivin u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom ((0)=uredan Doppler, (1)=patološki Doppler, 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

| Intenzitet reakcije – survivin | Uredan Doppler | Patološki Doppler |
|--------------------------------|----------------|-------------------|
| 1                              | 3 (7%)         | 3 (8.1%)          |
| 2                              | 40 (93%)       | 34 (91.9%)        |

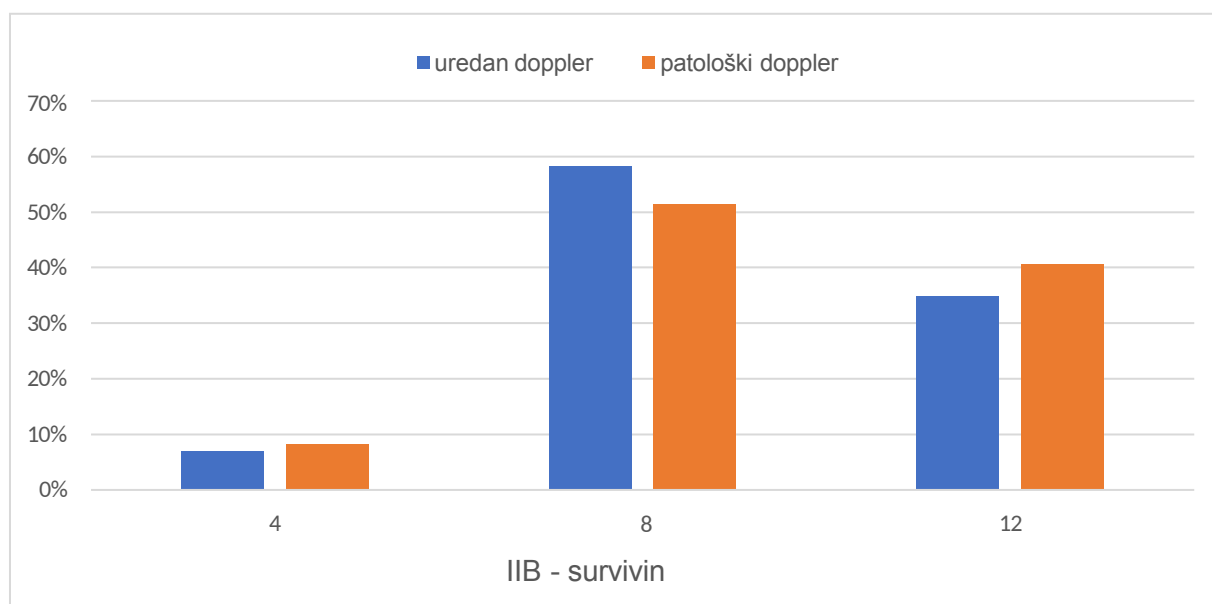


Slika 41. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za survivin u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

Ekspresija survivin proteina iskazana je putem imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) i prema njegovoj vrijednosti ekspresija je podijeljena u 3 skupine. U ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i patološkim nalazom Dopplera kao i u skupini s urednim Dopplerom najviše je bio zastupljen IIB u skupini 8 koji je evidentiran u devetnaest posteljica (51.4%) s patološkim Dopplerom i dvadeset i pet posteljica s urednim Dopplerom (58.1%). Rezultati su prikazani u Tablici 58 i na Slici 42.

Tablica 58. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za survivin u skupini sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom: ((0)=uredan Doppler, (1)=patološki Doppler, 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

| IIB – survivin | Uredan Doppler (0) | Patološki Doppler (1) |
|----------------|--------------------|-----------------------|
| 4              | 3 (7%)             | 3 (8.1%)              |
| 8              | 25 (58.1%)         | 19 (51.4%)            |
| 12             | 15 (34.9%)         | 15 (40.5%)            |

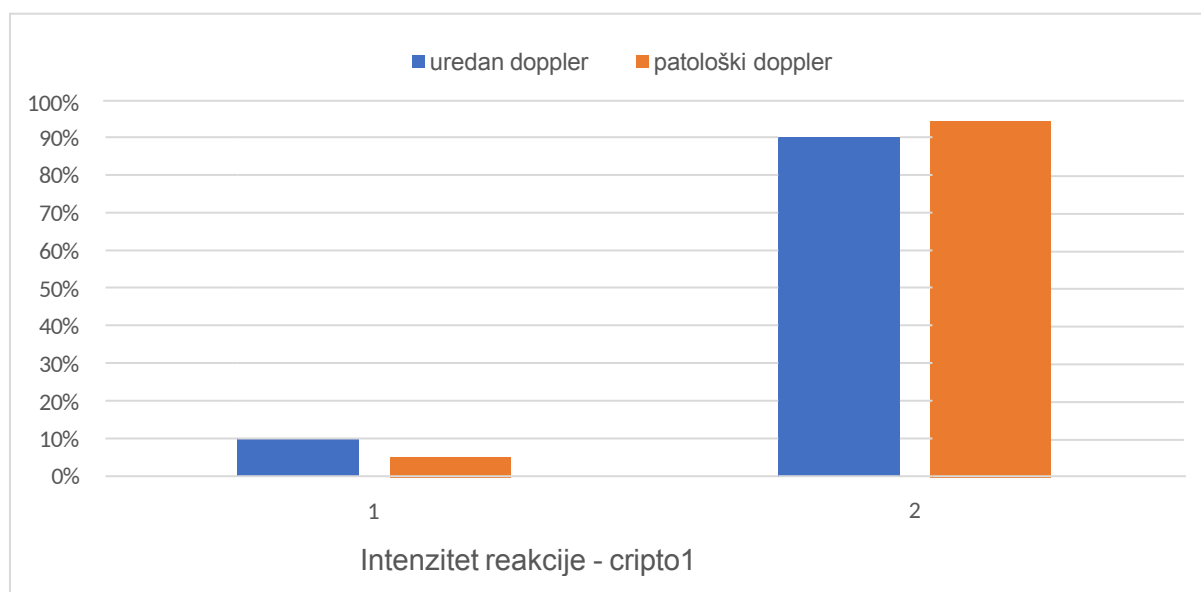


Slika 42. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za survivin u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

Nadalje je analizirana ekspresija cripto-1 proteina prema intenzitetu stanične reakcije (IR) u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim nalazom Dopplera. U ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta i patološkim Dopplerom najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je evidentiran u trideset i pet posteljica (94.6%). U skupini sa zastojem fetalnog rasta i urednim Dopplerom također je najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 2 koji je zapažen u trideset i devet posteljica (90.7%). Rezultati su prikazani u Tablici 59 i na Slici 43.

Tablica 59. Intenzitet stanične reakcije za cripto-1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom ((0)=uredan Doppler, (1)=patološki Doppler, 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

| Intenzitet reakcije – cripto-1 | Uredan Doppler | Patološki Doppler |
|--------------------------------|----------------|-------------------|
| 1                              | 4 (9.3%)       | 2 (5.4%)          |
| 2                              | 39 (90.7%)     | 35 (94.6%)        |

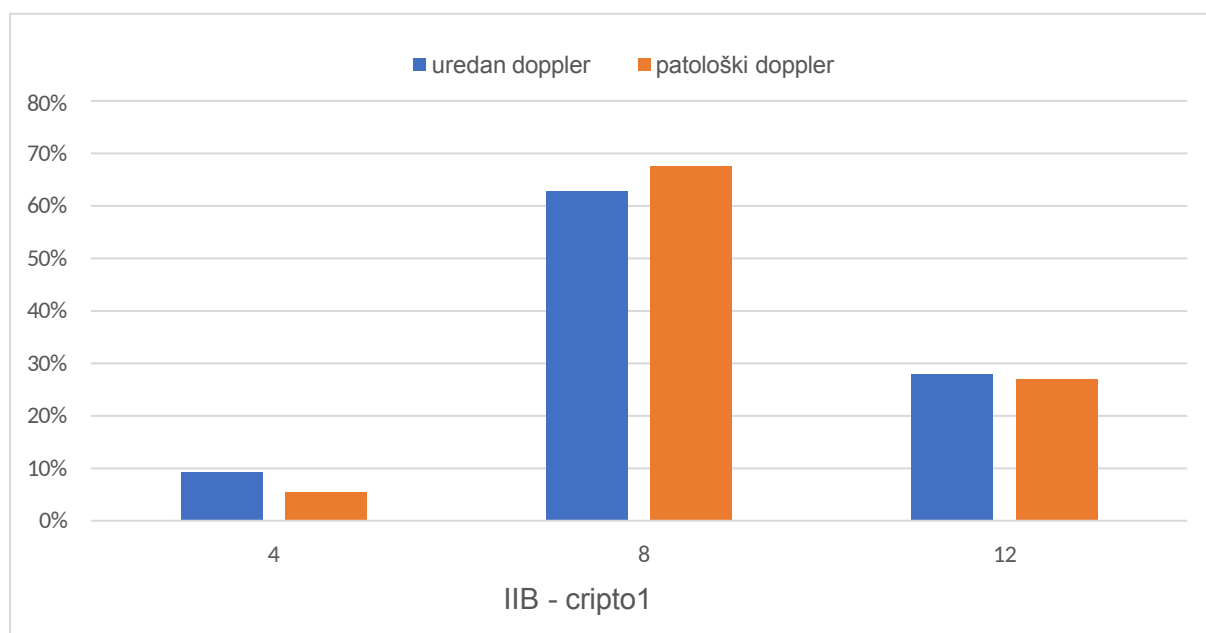


Slika 43. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za cripto-1 u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije)

U istraživanju je ekspresija cripto-1 proteina iskazana putem imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) i prema njegovoj vrijednosti ekspresija je podijeljena u 3 skupine. U ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i patološkim nalazom Dopplera kao i u skupini s urednim Dopplerom najviše je bio zastupljen IIB u skupini 8 koji je zapažen u dvadeset i pet posteljica (67.6%) s patološkim Dopplerom i dvadeset i sedam posteljica s urednim Dopplerom (62.8%). Rezultati su prikazani u Tablici 60 i na Slici 44.

Tablica 60. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za cripto-1 u skupini sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom: ((0)=uredan Doppler, (1)=patološki Doppler, 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

| IIB – cripto-1 | Uredan Doppler | Patološki Doppler |
|----------------|----------------|-------------------|
| 4              | 4 (9.3%)       | 2 (5.4%)          |
| 8              | 27 (62.8%)     | 25 (67.6%)        |
| 12             | 12 (27.9%)     | 10 (27%)          |



Slika 44. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za cripto-1 u ispitivanoj skupini s urednim i patološkim Dopplerom (4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

U ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika u paritetu i spolu između posteljica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na nalaz Dopplera. Statistički nije utvrđena značajna razlika ekspresije Ptch1, survivina i cripto-1 proteina između posteljica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na nalaz Dopplera, dok je statistička razlika za Smo granična s obzirom na intenzitet reakcije stanica i imunohistokemijski indeks bojanja izračunati Hi-kvadrat korelacijskim testom usporedbe. Rezultati su prikazani u Tablici 61.

Tablica 61. Hi-kvadrat korelacijski test usporedbe pariteta, spola i ekspresije Ptch1, Smo, survivina i cripto-1 proteina u skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

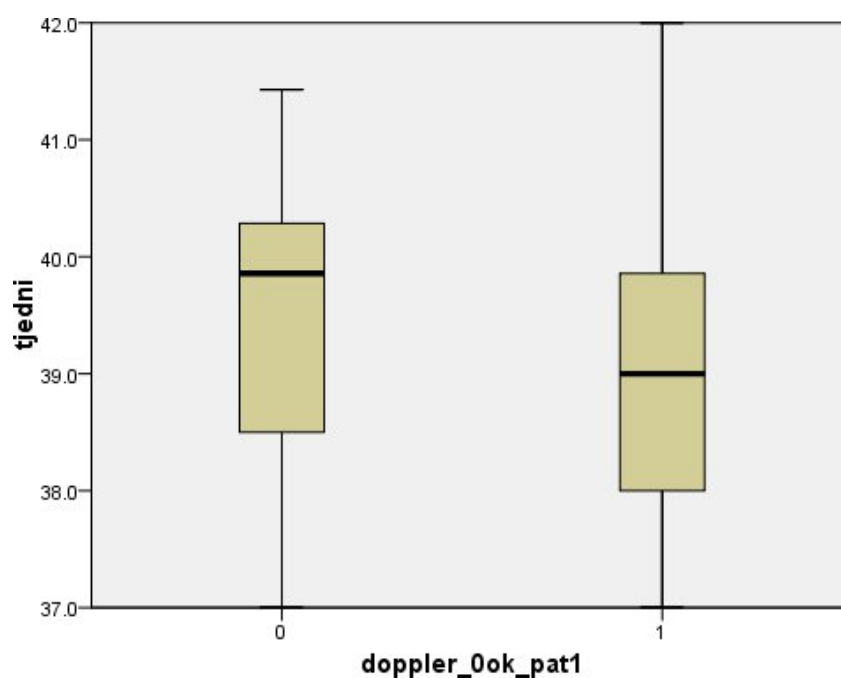
| Pearson Hi-kvadrat testovi     |            |                          |
|--------------------------------|------------|--------------------------|
|                                |            | Doppler-uredan/patološki |
| Paritet                        | Hi-kvadrat | .563                     |
|                                | df         | 2                        |
|                                | Sig        | .755                     |
| Spol                           | Hi-kvadrat | .671                     |
|                                | df         | 1                        |
|                                | Sig        | .413                     |
| Intenzitet reakcije – Ptch1    | Hi-kvadrat | 2.735                    |
|                                | df         | 1                        |
|                                | Sig        | .098                     |
| Intenzitet reakcije - Smo      | Hi-kvadrat | 3.771                    |
|                                | df         | 1                        |
|                                | Sig        | .052                     |
| Intenzitet reakcije - survivin | Hi-kvadrat | .037                     |
|                                | df         | 1                        |
|                                | Sig        | .848                     |
| Intenzitet reakcije – cripto-1 | Hi-kvadrat | .435                     |
|                                | df         | 1                        |
|                                | Sig        | .509                     |
| IIB – Ptch1                    | Hi-kvadrat | 3.836                    |
|                                | df         | 2                        |
|                                | Sig        | .147                     |
| IIB – Smo                      | Hi-kvadrat | 5.762                    |
|                                | df         | 2                        |
|                                | Sig        | .056                     |
| IIB – survivin                 | Hi-kvadrat | .370                     |
|                                | df         | 2                        |
|                                | Sig        | .831                     |
| IIB – cripto-1                 | Hi-kvadrat | .478                     |
|                                | df         | 2                        |
|                                | Sig        | .787                     |

Analizirano je prosječno trajanje trudnoće u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta i patološkim Dopplerom koje je iznosilo trideset i devet tjedana ( $SD \pm 1.31$ ) isto kao i u skupini s urednim Dopplerom ( $SD \pm 1.19$ ). Rezultati su prikazani u Tablici 62 i na Slici 45.



Tablica 62. Prikaz trajanja trudnoće u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1= patološki Doppler)

|        | Doppler | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|--------|---------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| Tjedni | 0       | 43 | 39.435              | 1.1907                | .1816                                   |
|        | 1       | 37 | 39.081              | 1.3199                | .2170                                   |

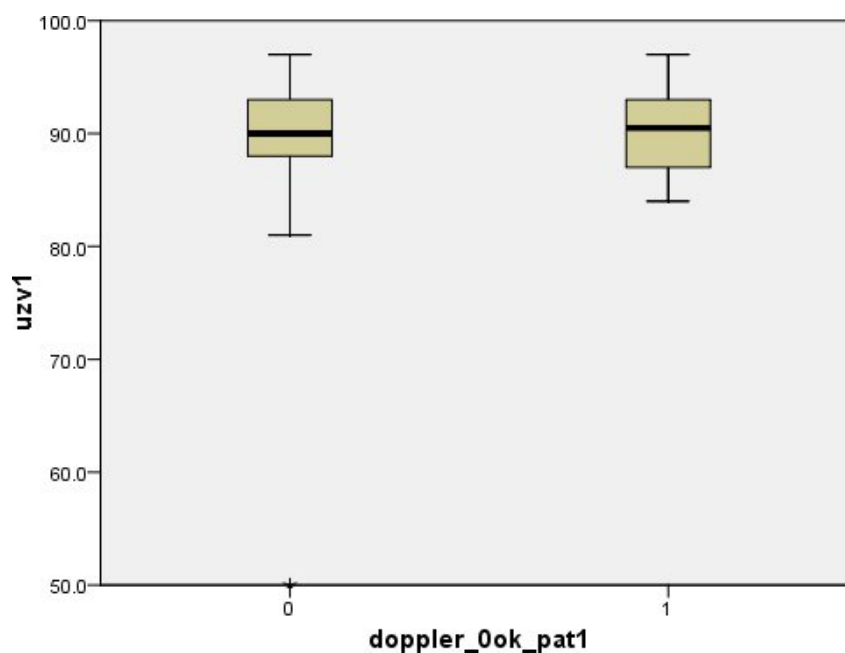


Slika 45. Grafički prikaz trajanja trudnoće u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1= patološki Doppler)

Ultrazvučno mjereni biparijetalni promjer glave fetusa je iznosio prosječno 90.14 mm ( $SD \pm 3.80$ ) u skupini sa zastojem rasta i patološkim Dopplerom, a 89.24 mm ( $SD \pm 7.18$ ) u skupini s urednim Dopplerom. Rezultati su prikazani u Tablici 63 i na Slici 46.

Tablica 63. Prikaza veličine biparijetalnog promjera glave u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1=patološki Doppler, UZV1=biparijetalni promjer glave ploda)

|      | Doppler | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|------|---------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| UZV1 | 0       | 41 | 89.244              | 7.1756                | 1.1206                                  |
|      | 1       | 34 | 90.147              | 3.8070                | .6529                                   |



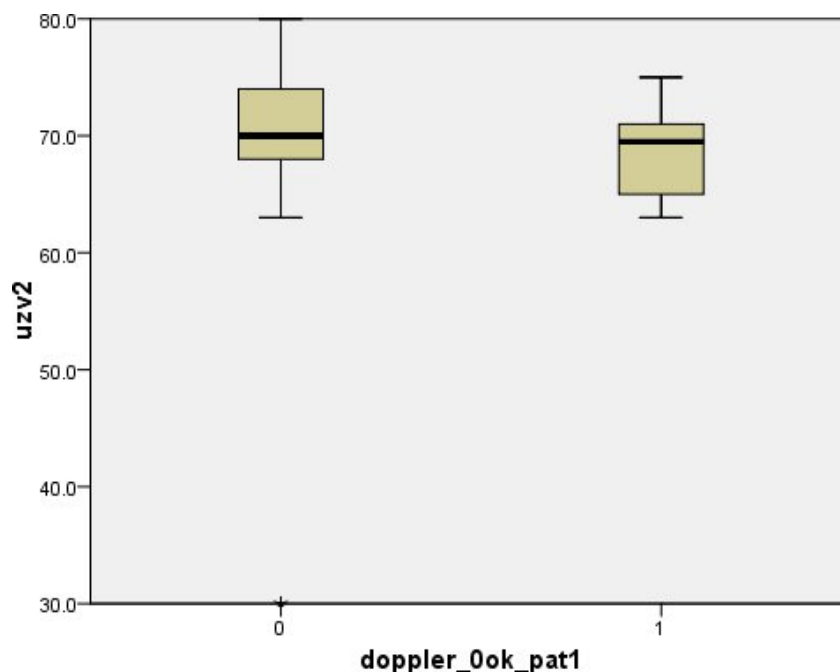
Slika 46. Grafički prikaz veličine biparijetalnog promjera glave ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1= patološki Doppler)

Ultrazvučno mjerena dužina bedrene kosti ploda je iznosila prosječno 68.9 mm ( $SD \pm 3.67$ ) u skupini sa zastojem rasta i patološkim Dopplerom, a 69.51 mm ( $SD \pm 7.40$ ) u skupini s urednim Dopplerom. Rezultati su prikazani u Tablici 64 i S na Slici 47.

Tablica 64. Prikaz dužine bedrene kosti ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1= patološki Doppler, UZV2=dužina bedrene kosti ploda)

|  | Doppler | N | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|--|---------|---|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
|--|---------|---|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|

|      |   |    |        |        |        |
|------|---|----|--------|--------|--------|
| UZV2 | 0 | 41 | 69.512 | 7.4099 | 1.1572 |
|      | 1 | 34 | 68.912 | 3.6711 | .6296  |

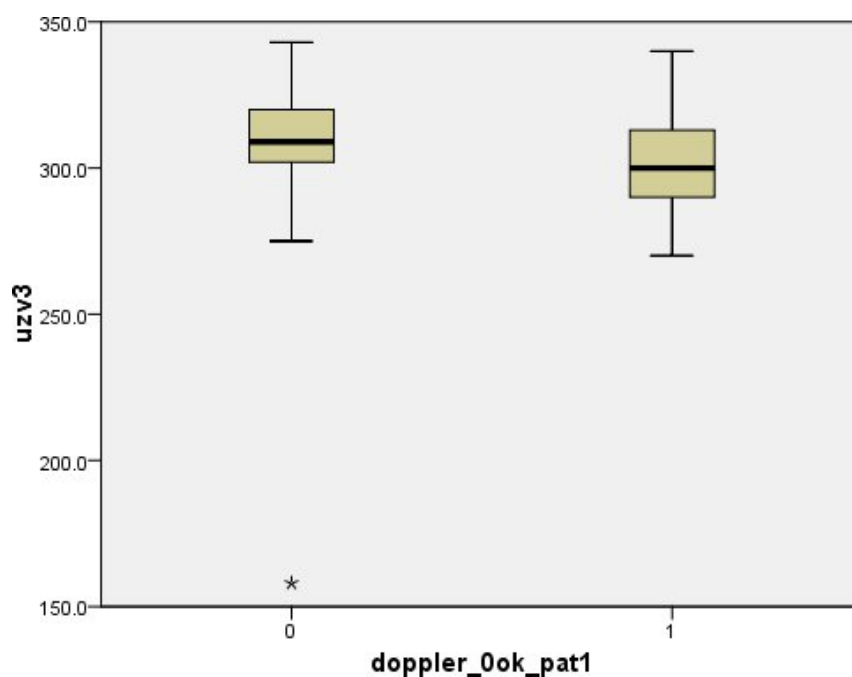


Slika 47. Grafički prikaz dužine bedrene kosti ploda ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1= patološki Doppler)

Ultrazvučno mjeren opseg trbuha ploda iznosio je prosječno 300.97 mm ( $SD \pm 17.59$ ) u skupini sa zastojem rasta i patološkim Dopplerom, a 306.61 mm ( $SD \pm 27.70$ ) u skupini s urednim Dopplerom. Rezultati su prikazani u Tablici 65 i na Slici 48.

Tablica 65. Prikaz opsega trbuha ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1= patološki Doppler, UZV3=opseg trbuha ploda)

|      | Doppler | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|------|---------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| UZV3 | 0       | 41 | 306.610             | 27.6983               | 4.3257                                  |
|      | 1       | 34 | 300.971             | 17.5939               | 3.0173                                  |

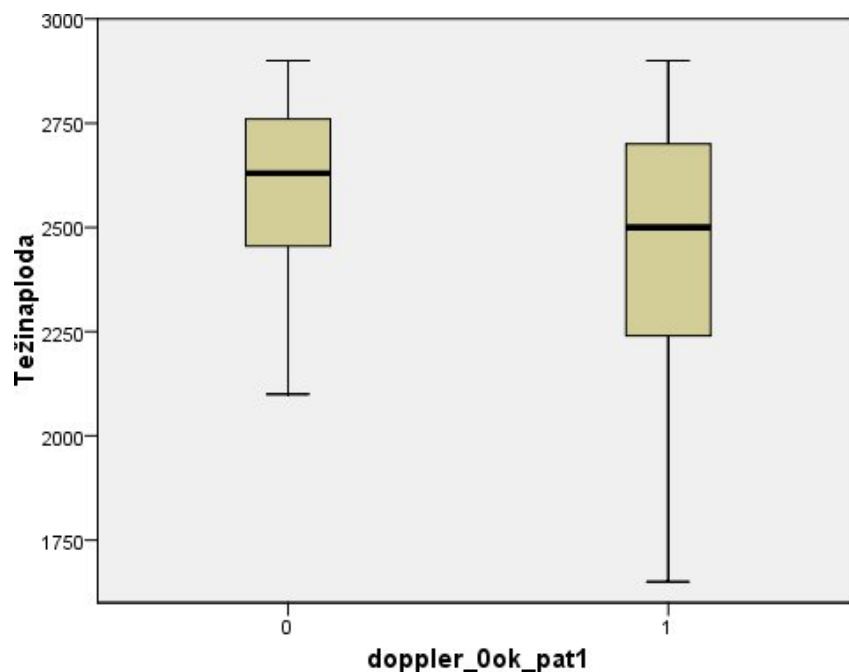


Slika 48. Grafički prikaz opsega trbuha ploda ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1=patološki Doppler)

Prosječna težina ploda u skupini sa zastojem fetalnog rasta i patološkim Dopplerom je iznosila 2449.73 g ( $SD \pm 303.10$ ), a u skupini s urednim Dopplerom 2596.28 ( $SD \pm 213.41$ ). Rezultati su prikazani u Tablici 66 i na Slici 49.

Tablica 66. Prikaz težine ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1=patološki Doppler)

|              | Doppler | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|--------------|---------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| Težina ploda | 0       | 43 | 2596.28             | 213.408               | 32.544                                  |
|              | 1       | 37 | 2449.73             | 303.100               | 49.829                                  |

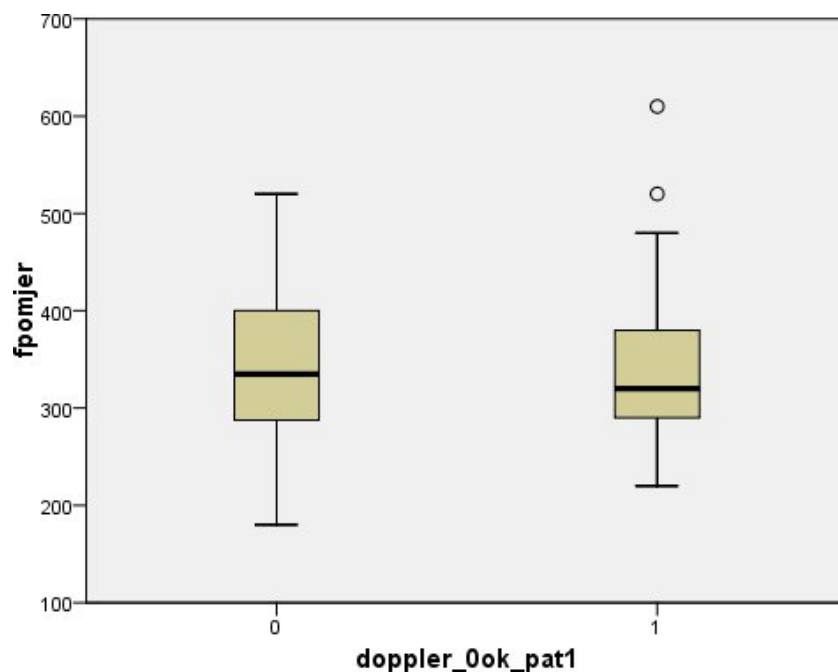


Slika 49. Grafički prikaz težine ploda ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1= patološki Doppler)

Prosječna vrijednost fetoplacentarnog (f/p) omjera u skupini sa zastojem fetalnog rasta i patološkim Dopplerom je iznosila 342.78. ( $SD \pm 81.58$ ), a u skupini s urednim Dopplerom 342.79 ( $SD \pm 77.70$ ). Rezultati su prikazani u Tablici 67 i na Slici 50.

Tablica 67. Prikaz vrijednosti fetoplacentarnog omjera (fp) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1= patološki Doppler)

|          | Doppler | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|----------|---------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| fp omjer | 0       | 43 | 342.79              | 77.700                | 11.849                                  |
|          | 1       | 37 | 342.78              | 81.579                | 13.411                                  |

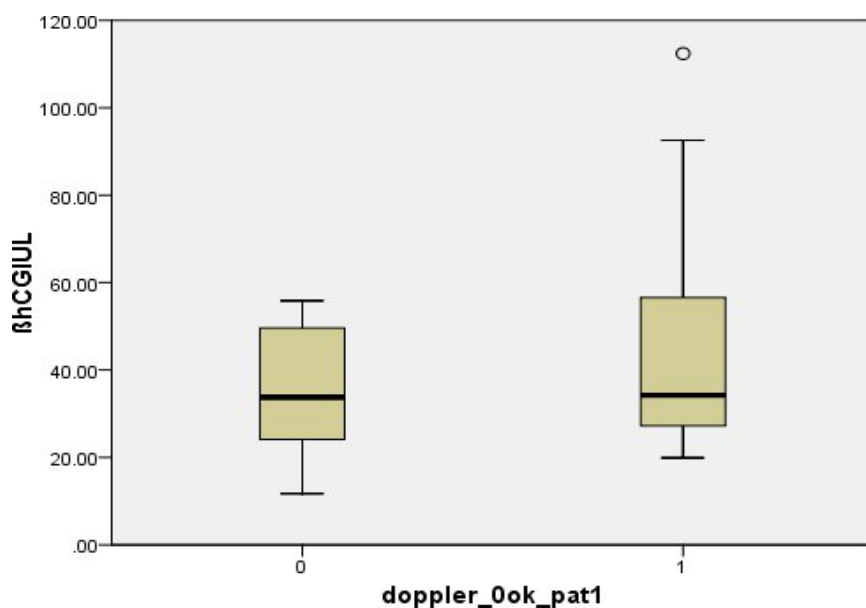


Slika 50. Grafički prikaz fetoplacentarnom omjera u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1=patološki Doppler)

Prosječna vrijednost  $\beta$ hCG-a u skupini sa zastojem fetalnog rasta i patološkim Dopplerom je iznosila 45.59 IU/L (SD $\pm$ 27.50), a u skupini s urednim Dopplerom 35.43 IU/L (SD $\pm$ 14.29). Rezultati su prikazani u Tablici 68 i na Slici 51.

Tablica 68. Prikaz vrijednosti  $\beta$ hCG-a (IU/L) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1=patološki Doppler)

|                    | Doppler | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|--------------------|---------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| $\beta$ hCG (IU/L) | 0       | 14 | 35.4286             | 14.29452              | 3.82037                                 |
|                    | 1       | 15 | 45.5913             | 27.49886              | 7.10018                                 |

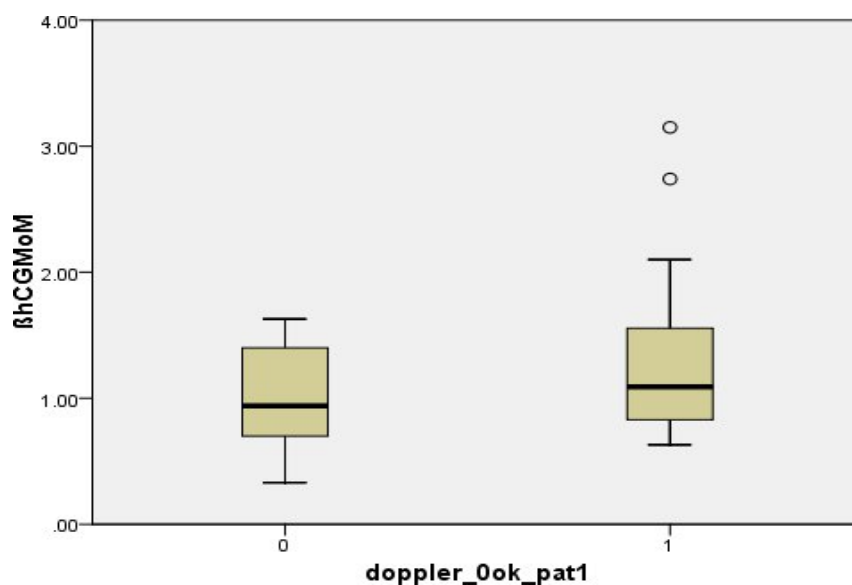


Slika 51. Grafički prikaz vrijednosti  $\beta$ hCG-a (IU/L) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1= patološki Doppler)

Prosječna vrijednost  $\beta$ hCG-a (MoM) u skupini sa zastojem fetalnog rasta i patološkim Dopplerom je iznosila 1.346 MoM ( $SD \pm 0.77$ ), a u skupini s urednim Dopplerom 0.999 MoM ( $SD \pm 0.412$ ). Rezultati su prikazani u Tablici 69 i na Slici 52.

Tablica 69. Prikaz vrijednosti  $\beta$ hCG-a (MoM) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplera (0=uredan Doppler, 1= patološki Doppler)

|                   | Doppler | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|-------------------|---------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| $\beta$ hCG (MoM) | 0       | 14 | .9993               | .41200                | .11011                                  |
|                   | 1       | 15 | 1.3460              | .76815                | .19834                                  |



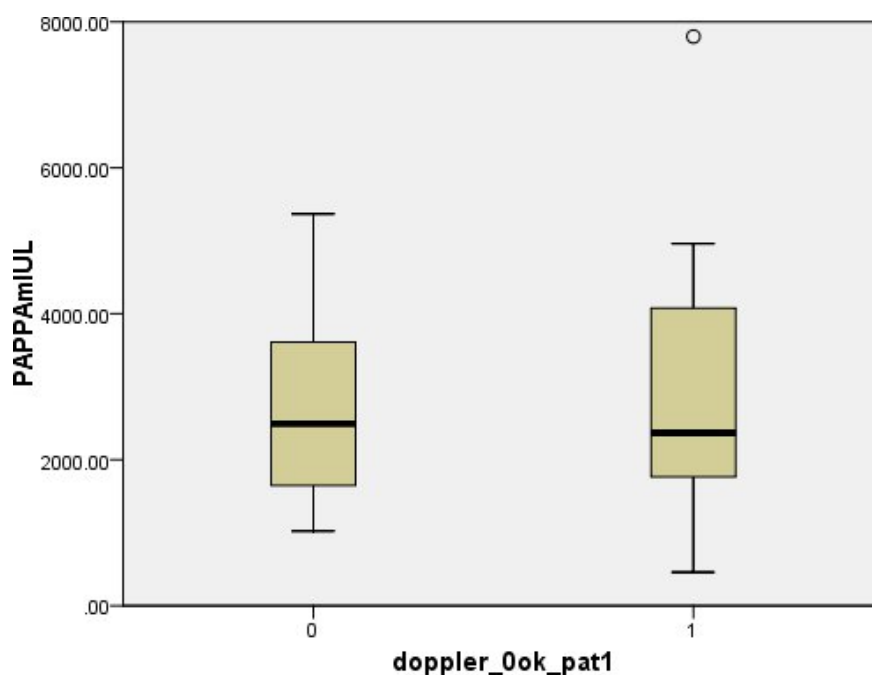
Slika 52. Grafički prikaz vrijednosti  $\beta$ hCG-a (MoM) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1= patološki Doppler)

Prosječna vrijednost PAPP-A (mIU/L) u skupini sa zastojem fetalnog rasta i patološkim Dopplerom je iznosila 3017.17 mIU/L ( $SD \pm 1840.67$ ), a u skupini s urednim Dopplerom 2671.29 mIU/L ( $SD \pm 1178.48$ ). Rezultati su prikazani u Tablici 70 i na Slici 53.

Tablica 70. Prikaz vrijednosti PAPP-A (mIU/L) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1=patološki Doppler)

|                | Doppler | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|----------------|---------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| PAPP-A (mIU/L) | 0       | 14 | 2671.2857           | 1189.48182            | 317.90239                               |
|                | 1       | 15 | 3017.1733           | 1840.67317            | 475.25977                               |



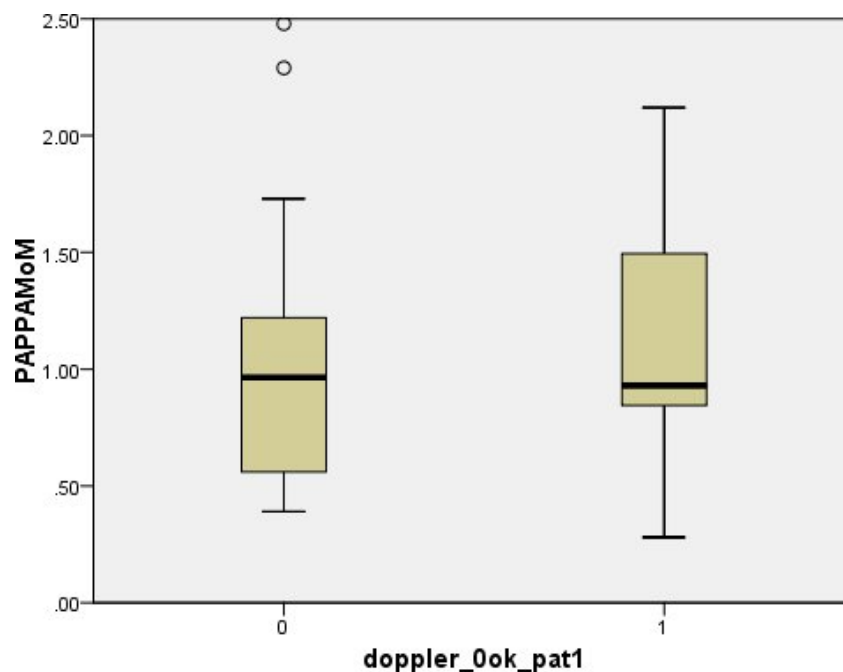


Slika 53. Grafički prikaz vrijednosti PAPP-A (mIU/L) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1= patološki Doppler)

Prosječna vrijednost PAPP-A (MoM) u skupini sa zastojem fetalnog rasta i patološkim Dopplerom je iznosila 1.123 MoM ( $SD \pm 0.564$ ), a u skupini s urednim Dopplerom 1.091 MoM ( $SD \pm 0.659$ ). Rezultati su prikazani u Tablici 71 i na Slici 54.

Tablica 71. Prikaz vrijednosti PAPP-A (MoM) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1= patološki Doppler)

|              | Doppler | N  | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | Standardna pogreška aritmetičke sredine |
|--------------|---------|----|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| PAPP-A (MoM) | 0       | 14 | 1.0907              | .65852                | .17600                                  |
|              | 1       | 15 | 1.1227              | .56435                | .14571                                  |



Slika 54. Grafički prikaz vrijednosti PAPP-A (MoM) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom (0=uredan Doppler, 1=patološki Doppler)

U ovom istraživanju utvrđena je statistički značajna razlika u težini ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na nalaz Dopplera mjerenih Levene korelacijskim testom usporedbe ( $p < 0,05$ ). Težina ploda je značajno manja u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta i patološkim nalazom Dopplera.

Nadalje nije utvrđena statistički značajna razlika u promatranim ostalim kategorijalnim obilježjima ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na nalaz Dopplera mjerenih Levene korelacijskim testom usporedbe. Rezultati su prikazani u Tablici 72.

Tablica 72. Levene korelacijski test usporedbe kategorijalnih obilježja (tjedni trudnoće, UZV1= biparijetalni promjera; UZV2=dužina bedrene kosti; UZV3=opseg trbuha; Fp=fetoplacentarni omjer; težina ploda,  $\beta$ hCG=humani koronski gonadotropin; PAPP-A=plazmatski protein trudnoće A) između ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim nalazom Dopplera.

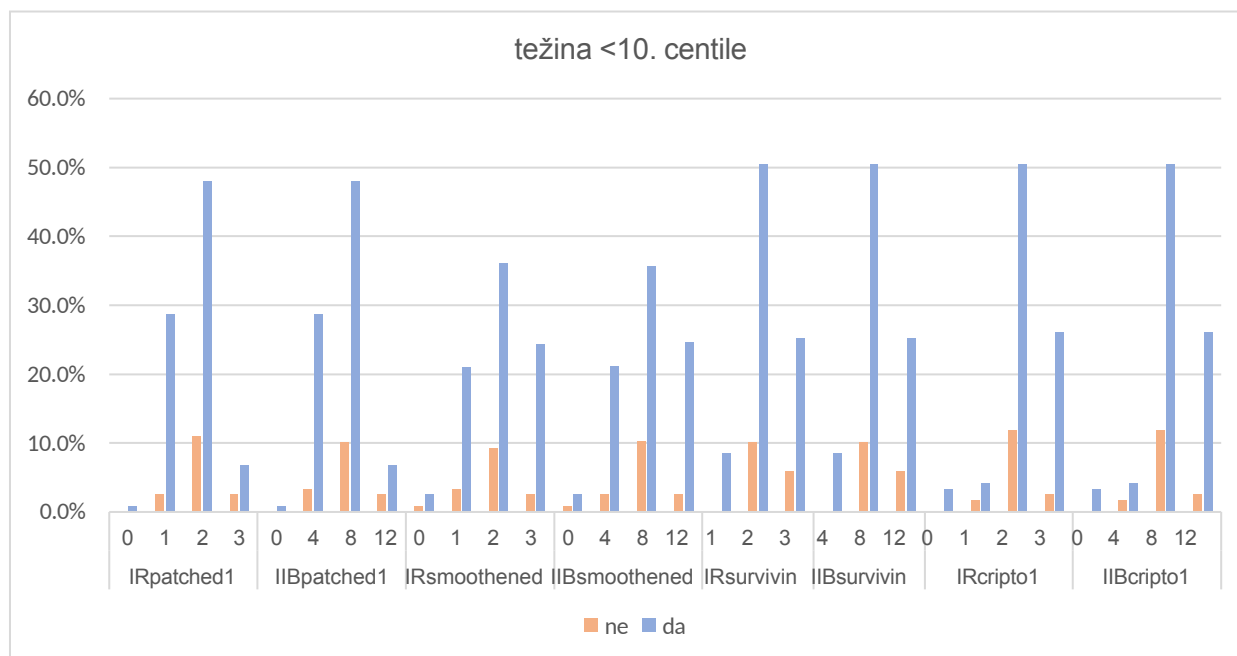
| Independent Samples Test |                                        |             |              |
|--------------------------|----------------------------------------|-------------|--------------|
|                          |                                        | Levene test | p            |
| Tjedni                   | Pretpostavljene jednake varijance      | .901        | 0.211        |
| UZV1                     | Pretpostavljene jednake varijance      | .506        | 0.511        |
| UZV2                     | Pretpostavljene jednake varijance      | .338        | 0.668        |
| UZV3                     | Pretpostavljene jednake varijance      | .947        | 0.308        |
| Težina ploda             | Nisu pretpostavljene jednake varijance | .015        | <b>0.017</b> |
| fp omjer                 | Pretpostavljene jednake varijance      | .916        | 1.000        |
| $\beta$ hCG (IU/L)       | Pretpostavljene jednake varijance      | .062        | 0.228        |
| $\beta$ hCG (MoM)        | Pretpostavljene jednake varijance      | .067        | 0.146        |
| PAPP-A (mIU/L)           | Pretpostavljene jednake varijance      | .207        | 0.556        |
| PAPP-A (MoM)             | Pretpostavljene jednake varijance      | .769        | 0.889        |

#### **4.7 Imunohistokemijska analiza ekspresije proteina Ptch1, Smo, survivina, cripto-1 i morfološke promjene u posteljicama iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta.**

Analizirana je ekspresija proteina Ptch1, Smo, survivina i cripto-1 u odnosu na morfološke promjene u posteljicama iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta.

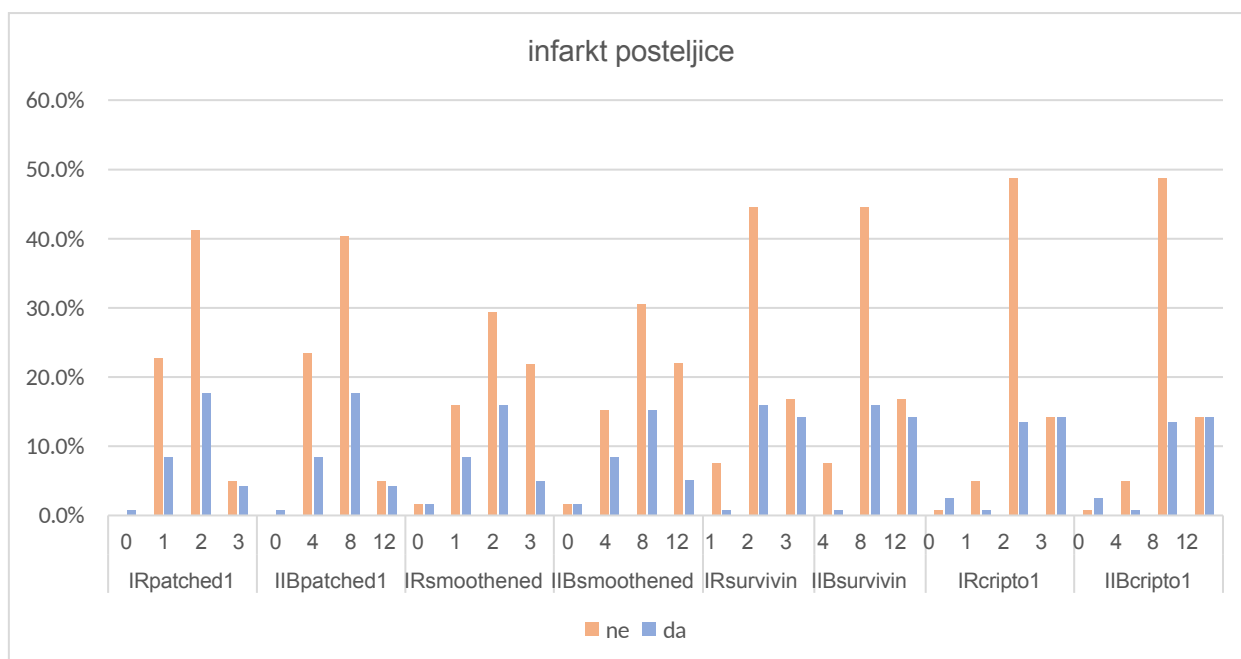
U ispitivanoj skupni s posteljicama čija je težina bila < 10. centile za gestacijsku dob najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 za sve ispitivane proteine ( Ptch1 47.9%, Smo 36.1%, survivin 50.4% i cripto-1 50.4%), dok je imunohistokemijski indeksa bojanja (IIB) najviše bio

zastupljen u skupini 8 (Ptch 47.9%, Smo 35.6%, survivin 50.4% i cripto-1 54.4%). Rezultati su prikazani na Slika 55.



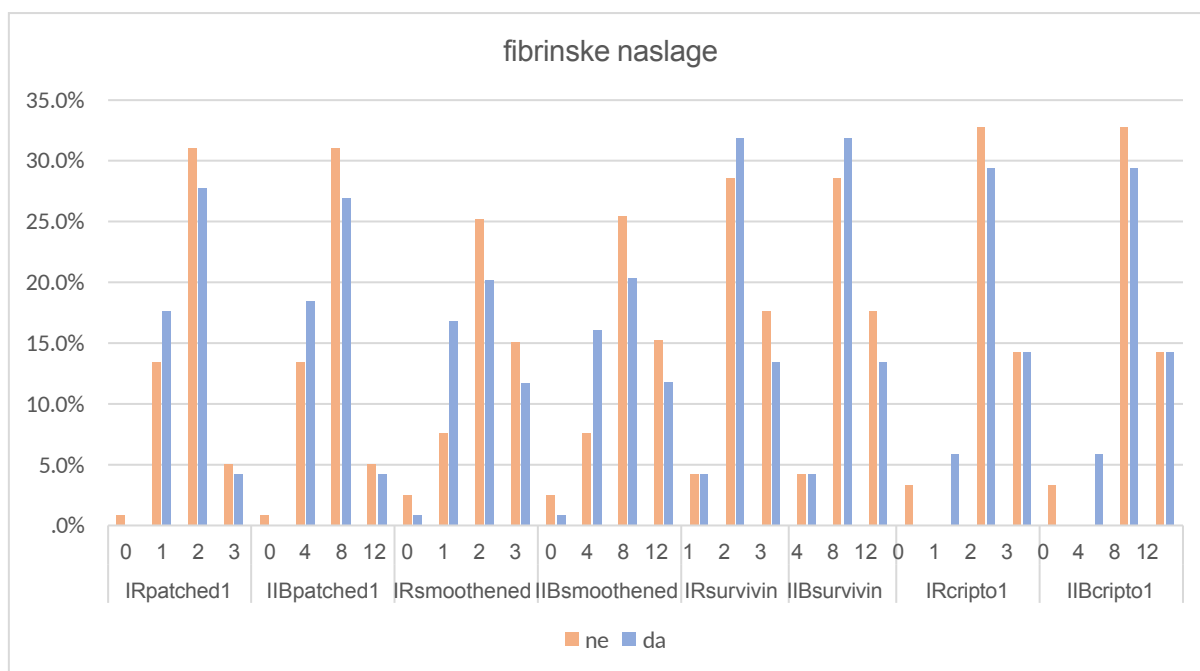
Slika 55. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije IR i imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1, Smo, survivin i cripto-1 u ispitivanoj skupini posteljica s težinom <10. centile za gestacijsku dob (IR- 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije; IIB- 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

U posteljicama s infarktom u patohistološkom nalazu najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 za proteine Ptch1 (17.6%), Smo (16%) i survivin (16%), dok je imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) najviše bio zastupljen u skupini 8 (Ptch1 17.6%, Smo 15.3%, survivin 16%). Za protein cripto-1 najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 3 (14.3%) i imunohistokemijski indeks bojanja u skupini 12 (14.3%). Rezultati su prikazani na Slici 56.



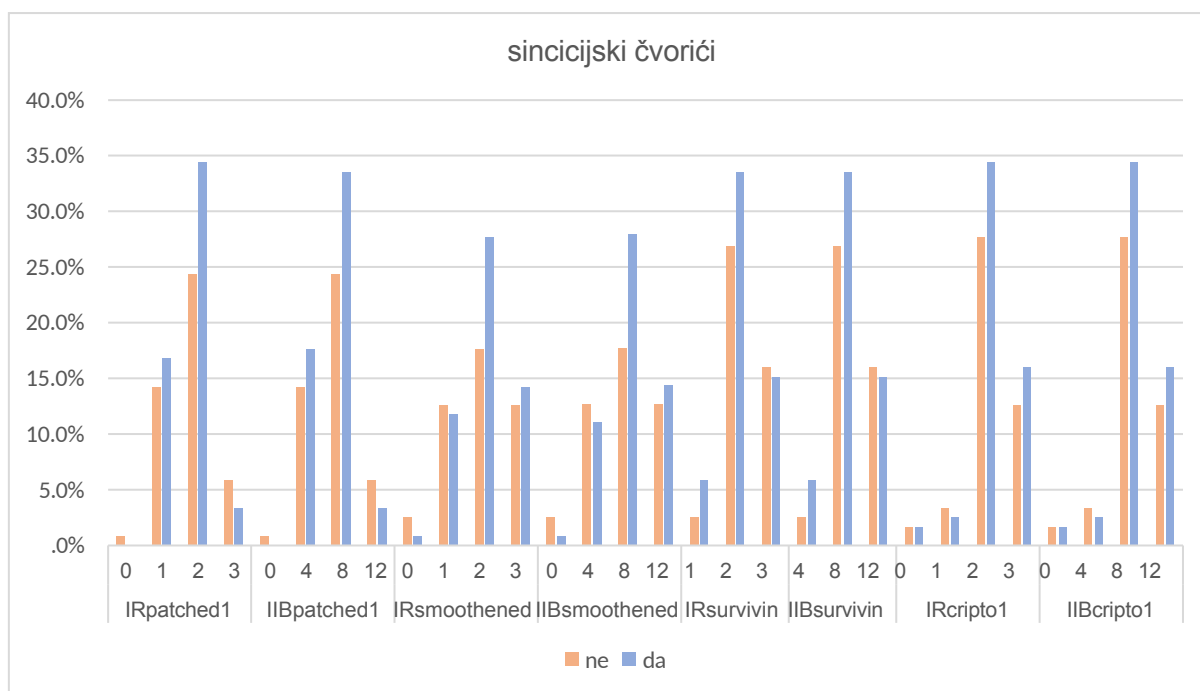
Slika 56. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije IR i imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1, Smo, survivin i crypto-1 u ispitivanoj skupini posteljica s infarktom u patohistološkom nalazu (IR- 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije; IIB- 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

U odnosu na nalaz fibrinskih naslaga u patohistološkom nalazu posteljica sa zastojem fetalnog rasta najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 (Ptch1 27.7%, Smo 20.2%, survivin 31.9%, crypto-1 29.4%), dok je imunohistokemijski indeksa bojanja (IIB) najviše bio zastupljen u skupini 8 (Ptch1 26.9%, Smo 20.3%, survivin 31.9%, crypto-1 29.4%). Rezultati su prikazani na Slici 57.



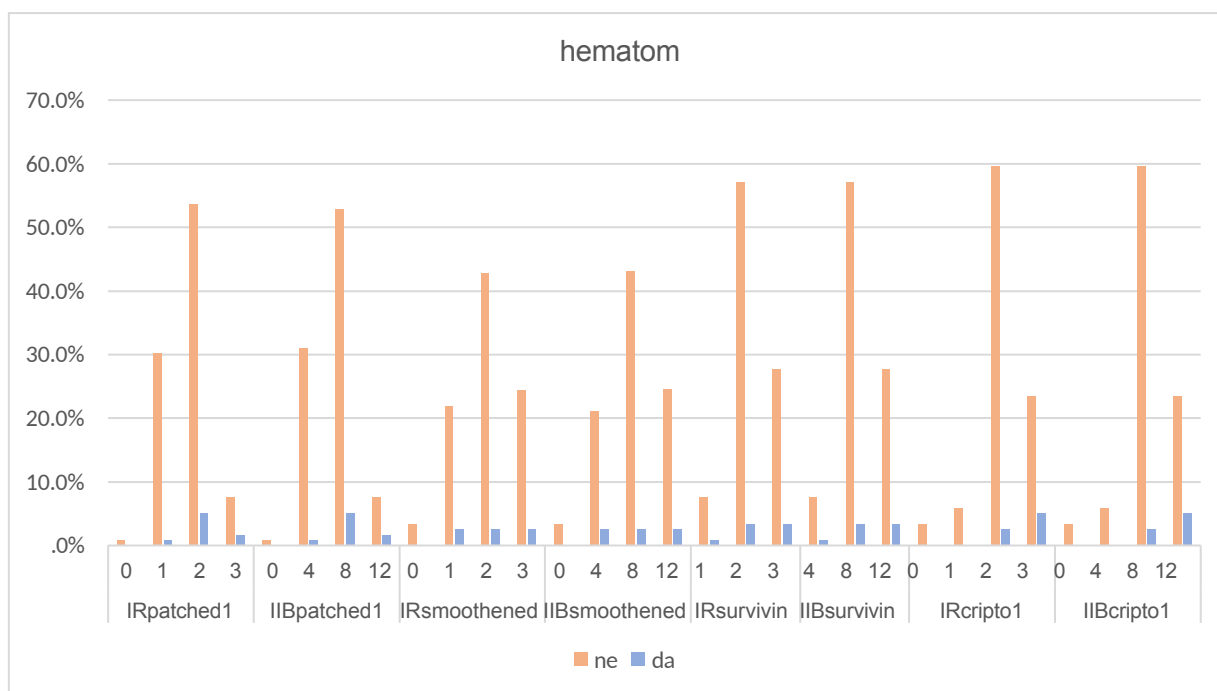
Slika 57. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije IR i imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1, Smo, survivin i cripto-1 u ispitivanoj skupini posteljica s nalazom fibrinskih naslaga u patohistološkom nalazu (IR- 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije; IIB- 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

U odnosu na nalaz sincicijskih čvorića u patohistološkom nalazu posteljica sa zastojem fetalnog rasta najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 (Ptch1 34.5%, Smo 27.7%, survivin 33.6%, cripto-1 34.5%), dok je imunohistokemijski indeksa bojanja (IIB) najviše bio zastupljen u skupini 8 (Ptch1 33.6%, Smo 28%, survivin 33.6%, cripto-1 34.5%). Rezultati su prikazani na Slici 58.



Slika 58. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije IR i imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1, Smo, survivin i crypto-1 u ispitivanoj skupini posteljica s nalazom sincicijskih čvorića u patohistološkom nalazu (IR- 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije; IIB- 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

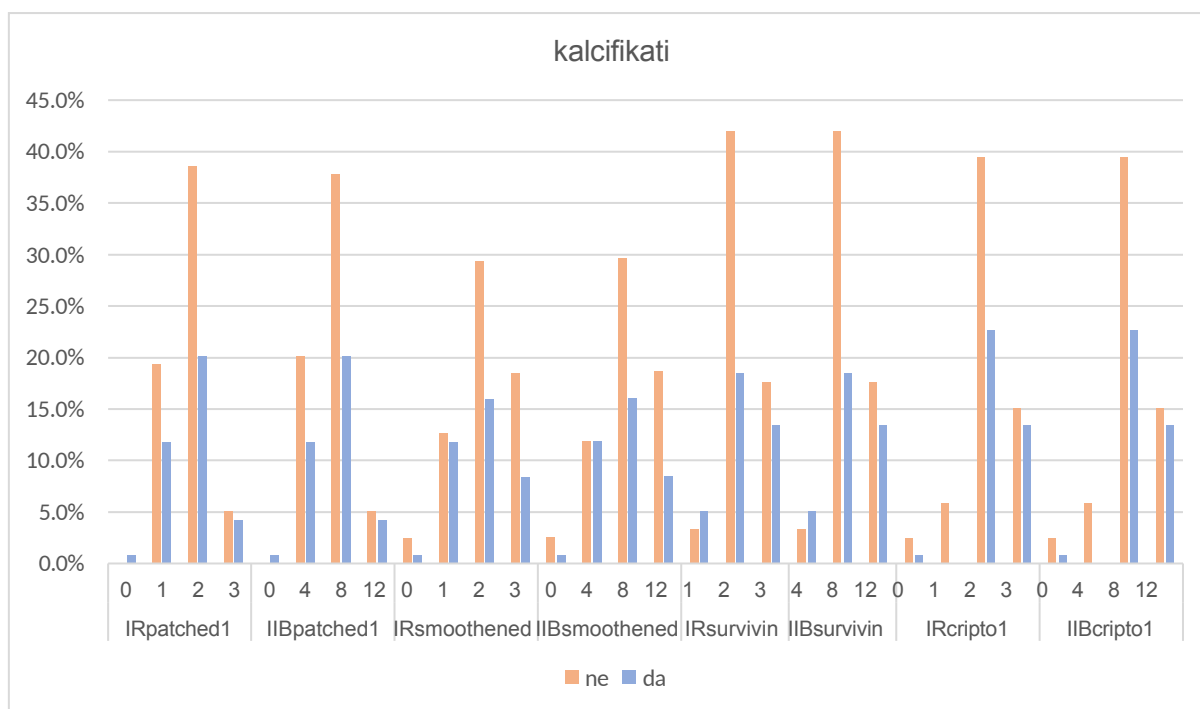
U posteljicama s hematonom u patohistološkom nalazu najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 za proteine Ptch1 (5%), Smo (2.5%) i survivin (3.4%), dok je imunohistokemijski indeksa bojanja (IIB) najviše bio zastupljen u skupini 8 (Ptch 5%, Smo 2.5%, survivin 3.4%). Za protein crypto-1 najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 3 (5%) i imunohistokemijski indeks bojanja u skupini 12 (5%). Rezultati su prikazani na Slici 59.



Slika 59. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije IR i imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1, Smo, survivin i cripto-1 u ispitivanoj skupini posteljica s nalazom hematoma u patohistološkom nalazu (IR- 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije; IIB- 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

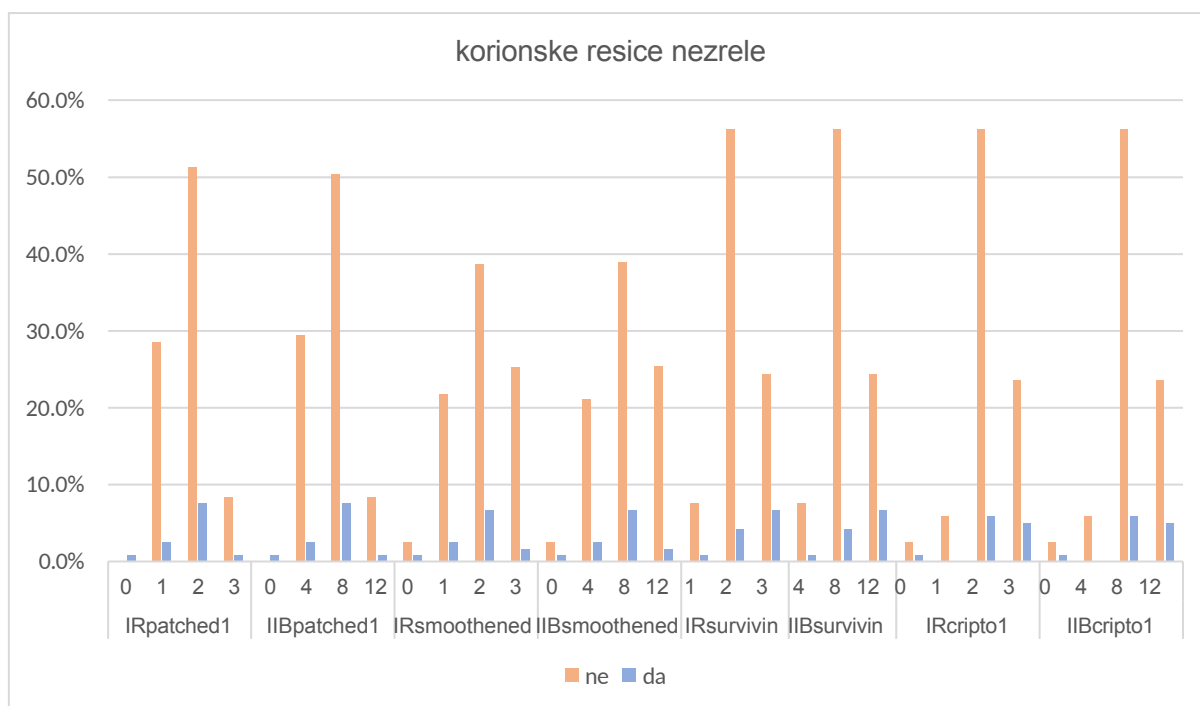
Analizirajući nalaz kalcifikata u patohistološkom nalazu posteljica sa zastojem fetalnog rasta utvrdili smo da je najviše bio zastupljen intenzitet reakcije 2 (Ptch1 20.2%, Smo 16%, survivin 18.5%, cripto-1 22.7%) dok je imunohistokemijski indeksa bojanja (IIB) najviše bio zastupljen u skupini 8 (Ptch1 20.2%, Smo 16.1%, survivin 18.5%, cripto-1 22.7%). Rezultati su prikazani na Slici 60.





Slika 60. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije IR i imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1, Smo, survivin i cripto-1 u ispitivanoj skupini posteljica s nalazom kalcifikata u patohistološkom nalazu (IR- 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije; IIB- 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

U posteljicama s nezrelim korionskim resicama u patohistološkom nalazu najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 2 za proteine Ptch1 (7.6%), Smo (6.7%) i cripto-1 5.9%, dok je imunohistokemijski indeksa bojanja (IIB) najviše bio zastupljen u skupini 8 (Ptch1 7.6%, Smo 6.8%, cripto-1 5.9%). Za protein survivin najviše je bio zastupljen intenzitet reakcije 3 (6.7%) i imunohistokemijski indeks bojanja u grupi 12 (6.0%). Rezultati su prikazani na Slici 61.



Slika 61. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije IR i imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1, Smo, survivin i crypto-1 u ispitivanoj skupini posteljica s nalazom nezrelih korionskih resica u patohistološkom nalazu (IR- 1= slab intenzitet reakcije, 2=umjereno jak intenzitet reakcije; IIB- 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja)

U ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika ekspresije Ptch1, Smo, survivina i crypto-1 proteina između posteljica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na patohistološke promjene tih posteljica (težina posteljica <10. centile, infarkt posteljice, fibrinske naslage, sincijski čvorići, hematomi, kalcifikati, nezrele korionske resice) izračunati Hi-kvadrat korelacijskim testom usporedbe. Rezultati su prikazani u Tablici 73.

Tablica 73. Hi-kvadrat korelacijski test usporedbe ekspresije Ptch1, Smo, survivina i cripto-1 proteina u skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s pojedinim patohistološkim promjenama i bez njih (0=bez patohistološke promjene, 1= s patohistološkom promjenom, težina posteljice: 0=>10. centile, 1=<10. centile za gestacijsku dob; korionske resice: 0=zrele, 1=nezrele)

| Pearson Hi-kvadrat testovi         |            |        |         |                   |                     |         |                         |                  |
|------------------------------------|------------|--------|---------|-------------------|---------------------|---------|-------------------------|------------------|
| Patohistološke promjene posteljice |            | Težina | Infarkt | Fibrinske naslage | Sincicijski čvorići | Hematom | Kalcifikat i posteljice | Korionske resice |
| Intenzitet reakcije-Ptch1          | Hi-kvadrat | 2,711  | 0,120   | 0,721             | 0,089               | 1,942   | 0,150                   | 0,082            |
|                                    | df         | 1      | 1       | 1                 | 1                   | 1       | 1                       | 1                |
|                                    | Sig.       | 0,100  | 0,729   | 0,396             | 0,765               | 0,163   | 0,699                   | 0,774            |
| Intenzitet reakcije - Smo          | Hi-kvadrat | 0,23   | 0,592   | 3,609             | 1,548               | 0,152   | 1,409                   | 0,006            |
|                                    | df         | 1      | 1       | 1                 | 1                   | 1       | 1                       | 1                |
|                                    | Sig.       | 0,881  | 0,442   | 0,057             | 0,213               | 0,696   | 0,235                   | 0,940            |
| Intenzitet reakcije - survivin     | Hi-kvadrat | 2,074  | 2,267   |                   | 1,042               | 0,093   | 2,484                   | 0,33             |
|                                    | df         | 1      | 1       |                   | 1                   | 1       | 1                       | 1                |
|                                    | Sig.       | 0,150  | 0,132   |                   | 0,307               | 0,701   | 0,115                   | 0,856            |
| Intenzitet reakcije – cripto-1     | Hi-kvadrat | 0,044  | 0,157   | 0,958             | 0,411               | 0,992   | 4,044                   | 0,083            |
|                                    | df         | 1      | 1       | 1                 | 1                   | 1       | 1                       | 1                |
|                                    | Sig.       | 0,833  | 0,692   | 0,328             | 0,521               | 0,319   | 0,44                    | 0,773            |
| IIB Ptch1                          | Hi-kvadrat | 1,410  | 0,226   | 1,083             | 0,014               | 2,074   | 0,055                   | 0,127            |
|                                    | df         | 1      | 1       | 1                 | 1                   | 1       | 1                       | 1                |
|                                    | Sig.       | 0,235  | 0,635   | 0,298             | 0,906               | 0,150   | 0,815                   | 0,721            |
| IIB Smo                            | Hi-kvadrat | 0,422  | 1,012   | 3,130             | 1,946               | 0,190   | 1,726                   | 0,017            |
|                                    | df         | 1      | 1       | 1                 | 1                   | 1       | 1                       | 1                |
|                                    | Sig.       | 0,516  | 0,314   | 0,077             | 0,163               | 0,663   | 0,189                   | 0,896            |
| IIB survivin                       | Hi-kvadrat | 2,074  | 2,267   | 0,001             | 1,042               | 0,093   | 2,484                   | 0,033            |
|                                    | df         | 1      | 1       | 1                 | 1                   | 1       | 1                       | 1                |
|                                    | Sig.       | 0,150  | 0,132   | 0,978             | 0,307               | 0,761   | 0,115                   | 0,856            |
| IIB cripto-1                       | Hi-kvadrat | 0,044  | 0,157   | 0,958             |                     | 0,0992  | 4,044                   | 0,83             |

|  |      |       |       |       |  |       |       |       |
|--|------|-------|-------|-------|--|-------|-------|-------|
|  | df   | 1     | 1     | 1     |  | 1     | 1     | 1     |
|  | Sig. | 0,833 | 0,692 | 0,328 |  | 0,319 | 0,044 | 0,773 |

## 5. RASPRAVA

Intrauterini zastoj fetalnog rasta trudnoća značajan je problem suvremene perinatologije zbog visokog perinatalnog morbiditeta i mortaliteta, a ujedno predstavlja i veliki javno-zdravstveni problem jer nosi zdravstvene rizike za majku i dijete [110].

Takva djeca su sklona intrauterinom mortalitetu i morbiditetu uključujući cerebralnu paralizu, prematuritet, kasnije cerebrovaskularne, neurološke, imunološke, endokrine i druge bolesti. Također je dokazano da majke koje su rađale djecu sa zastojem rasta nose predispoziciju za kardiovaskularne bolesti kasnije u životu.

Intrauterini zastoj rasta se javlja u 10% svih trudnoća, a 75% slučajeva ostaje neprepoznat do poroda. U trudnica koje nemaju poznate faktore rizika za intrauterini zastoj rasta on se dijagnosticira samo u 15% slučajeva. Poboljšanjem suvremene perinatalne skrbi smrtnost zbog intrauterinog zastoja rasta je smanjena četiri puta. Trenutačne strategije liječenja još uvijek nisu kurativne i uglavnom se oslanjaju na pravovremeni porod [111].

Cilj ovog rada je bio analizirati ekspresiju proteina koji sudjeluju u diferencijaciji trofoblasta u zdravim posteljicama te posteljicama iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta.

U urednim trudnoćama tijekom razvoja posteljice dolazi do prelaska viloznog trofoblasta u multinuklearni sinciotrofoblast, a stanice ekstraviloznog trofoblasta infiltriraju endometrij i modeliraju majčine krvne žile [112].

Za placentaciju je bitan proces epitelno-mezenhimalne tranzicije kojim se humani placentarni citotrofoblast diferencira u invazivni ekstravilozni citotrofoblast tj. dolazi do staničnog prijelaza iz epitelnog fenotipa u mezenhimalni [6, 7]. EMT omogućuje intersticijsku i endovaskularnu invaziju stanica trofoblasta, a MET doprinosi zaustavljanju invazije stanica trofoblasta. U regulaciji ove tranzicije sudjeluju signalni putevi koji se međusobno prepliću kako bi potaknuli EMT procese, a jedan od tih puteva je Hedgehog signalni put. Glavni ciljni geni Hh signalnog puta su *Ptch1*, *Ptch2* i *Gli1*. Hedgehog signalni put regulira ekspresiju EMT-povezanih gena i poremećaj tog mehanizma u odrasloj dobi može uzrokovati nastanak malignih bolesti i potaknuti razvoj metastaza.

U ovom radu analizirali smo do sada slabije istraženu ekspresiju regulatora Hh signalnog puta proteina *patched1* i *smoothed*, inhibitora apoptoze *survivin* proteina te proteina *cripto-1*.

Pretpostavili smo o da će u tkivima posteljica koje prati zastoj fetalnog rasta biti pojačana ekspresija patched 1 i smoothened proteina, a oslabljena ekspresija cripto-1 i survivin proteina u odnosu na normalne posteljice s urednim fetalnim rastom.

S obzirom na to da je prema današnjim spoznajama neuspješna invazija trofoblasta zapažena u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta istražili smo aktivnost Hh signalnog puta mjereći ekspresiju Ptch1 i Smo, te aktivnost proteina survivina i cripto-1 uspoređujući ih s njihovom ekspresijom u stanicama posteljica iz urednih trudnoća. S obzirom na to da inhibicija Hh puta sprječava regularno odvijanje procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije čime se smanjuje sposobnost migracije i pretvorbe trofoblasta pretpostavili smo da ćemo dobiti pojačanu ekspresiju Ptch1 i Smo, a smanjenu ekspresiju cripto-1 kao snažnog induktora EMT-a i survivina kao inhibitora apoptoze i stanične diobe [59, 65].

U ovom istraživanju najprije smo usporedili kontinuirana obilježja: dob majke, trajanje trudnoće, težinu djeteta, spol djeteta, paritet majki između urednih trudnoća i trudnoća s zastojem fetalnog rasta.

Vrijednost ostalih parametara (ultrazvučno mjerenja biparijetalnog promjera, dužine bedrene kosti, opsega trbuha; fetoplacentarni omjer, vrijednost  $\beta$ hCG i PAPP-A) nisu bili dostupni za kontrolnu skupinu zdravih trudnica te u ovom radu nisu uspoređivani.

Rezultati su pokazali da se skupine **nisu statistički značajno razlikovale prema trajanju** trudnoće i spolu djeteta što je očekivani rezultat jer su u istraživanje uključene posteljice iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta i urednih trudnoća čije je trajanje  $\geq 37$  tjedana, odnosno uključene su terminske trudnoće.

Daljnijim analiziranjem utvrđena je značajna statistička razlika u paritetu majki. U ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta više je bilo prvorođetki što se može tumačiti prisustvom kod njih na vrijeme neprepoznatih čimbenika rizika kao što je gestacijska hipertenzija ili šećerna bolest. Bartsch i suradnici 2016.g. su u sustavnom pregledu i meta analizi kohortnih studija istakli da žene koje nisu prethodno rađale imaju povećani rizik i učestaliju pojavu preeklampsije kao čimbenika rizika za razvoj insuficijencije posteljice.

Naše istraživanje je pokazalo da postoji statistički **značajna razlika u starosti majke** između ispitivanih skupine. U skupini ispitanica s zastojem fetalnog rasta **dob majki je bila viša** što se može tumačiti povišenim rizikom starije dobi na pojavu komplikacija u trudnoći. Starije

rodilje češće imaju dodatne čimbenike rizika kao što je pretilost, šećerna bolest, kronična hipertenzija i drugo.

Ogawa i suradnici su izvijestili 2018. u svom istraživanju da dob trudnica nosi povišen rizik za majčin morbiditet uključujući rizik za dovršenje poroda carskim rezom, preeklampsiju i placentu previju. Rizik od prijevremenog poroda, niske porođajne težine i intrauterinog zastoja fetalnog rasta iznose 3-20%, a utjecaj starije životne dobi razlikuje se po načinu začeća i paritetu. Učinak dobi na ishod trudnoće i pojavu komplikacija općenito je bio manji kod žena koje su začele umjetnom oplodnjom, te među prvorotkama [113].

**Rezultati su pokazali da postoji značajna statistička razlika u težini djece između skupina sa zastojem fetalnog rasta i zdravih kontrola.** U skupini s zastojem fetalnog rasta djeca su bila niže porođajne težine što ukazuje na postojanje čimbenika koji doprinose poremećaju rasta fetusa i funkcije posteljice što je očekivani rezultat.

### **5.1 Ekspresija proteina Ptch1**

U daljem radu analizirali smo ekspresiju Ptch1 proteina u posteljicama iz trudnoća kompliciranih intrauterinim zastojem rasta i kontrolama.

Ekspresiju Ptch1, smoothend, cripto-1 i survivin proteina smo imunohistokemijski kvantitativno iskazali u vidu apsolutnih brojeva i postotku pozitivno obojenih staničnih elemenata (PPS), intenziteta stanične reakcije (IR) i imunohistokemijskog indeksa bojenja (IIB).

Rezultati dobiveni usporedbom posteljica iz trudnoća kompliciranih s intrauterinim zastojem rasta s kontrolnom skupinom posteljica iz urednih trudnoća očekivano pokazuju statistički značajno veću ekspresiju Ptch1 u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta. Iz toga možemo zaključiti da je u posteljicama s IUGR značajnije inhibiran prijenos signala Hh signalnim putem, što može imati za posljedicu slabiju epitelno-mezenhimalnu tranziciju ekstraviloznog trofoblasta. Aberantni razvoj trofoblasta povezan je s teškim komplikacijama trudnoće uključujući intrauterini zastoj fetalnog rasta. Rezultati istraživanja nam ukazuju na to da je regulacija invazije trofoblasta jedan od važnih čimbenika patologije trudnoće.

Pan i suradnici su u svom istraživanju na miševima istaknuli da poremećaj Shh signala dovodi do poremećaja vaskulogeneze embrija, manjeg grananja i malformacija posteljičnih krvnih žila što ima za posljedicu značajnog smanjenja kapaciteta transplacentarnog protoka. Njihovi rezultati otkrivaju da su Shh/Gli2 i Shh/Gli3 signali potrebni za pravilan razvoj mišjih posteljica.

Rezultati našeg istraživanja su u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Kottek i suradnici a koji su izvijestili da je ekspresija Ptch1 i Gli3 bila značajno veća u terminskim IUGR posteljicama u odnosu na kontrolnu skupinu terminskih trudnoća. Također ekspresija Gli3 u terminskim IUGR posteljicama i zdravim kontrolama bila je statistički jače izražena u odnosu na Ptch1 u istima [114].

Možemo zaključiti da pojačana ekspresija Ptch1 u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta može imati za posljedicu smanjenu epitelno-mezenhimalnu tranziciju ekstraviloznog trofoblasta dovodeći do njegove slabije invazije u deciduu što posljedično dovodi do intrauterinog zastoja fetalnog rasta.

S obzirom na imunohistokemijski indeks bojenja sve ispitanice smo podijelili u dvije skupine: s nižim imunohistokemijskim indeksom bojenja (IIB=4) i višim imunohistokemijskim indeksom (IIB=8) za Ptch te smo analizirali ekspresiju s obzirom na kategorijalna obilježja.

U skupini pacijentica s jače izraženom ekspresijom Ptch1 statistički značajno je bila niža težina ploda, dok nije bilo statistički značajnije razlike u ostalim obilježjima. To je u skladu s rezultatima našeg istraživanja koji su pokazali da je težina ploda bila značajno niža kod trudnoća kompliciranih IUGR u odnosu na zdrave kontrole.

## **5.2 Ekspresija proteina Smo**

Zatim smo analizirali ekspresiju smoothend proteina u posteljicama iz trudnoća kompliciranih s intrauterinim zastojem fetalnog rasta i kontrolama.

U odsutnosti Hh liganda Ptch1 Smo je konstitutivno aktivan i dovodi do aktivacije i nuklearne translokacije nizvodnih transkripcijskih faktora Gli i indukcije ekspresije ciljnih Hh gena. U fiziološkim uvjetima aktivacija Hh signalnog puta uzrokovana je vezanjem Hh na Ptch1 što rezultira degradacijom Ptch1 i smanjenjem inhibitornog učinka na Smo. Točan mehanizam na koji Ptch1 inhibira Smo ostaje nejasan. Smo može aktivirati različite kanonske i nekanonske signalne puteve. Kanonski signalni put se provodi aktivacijom Hh ciljnog gena putem Gli transkripcijskih faktora neovisno o G proteinu. Suprotno tome, nekanonski put koristi Gli za regulaciju staničnih procesa uključujući metabolizam, proliferaciju i migraciju fibroblasta [40, 48].

Rezultati našeg istraživanja dobiveni usporedbom posteljica dviju skupina nisu pokazali značajnu statističku razliku u ekspresiji Smo između posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnih posteljica iz urednih trudnoća. Isto tako nije utvrđena statistički značajna razlika u



jačini ekspresije Smo u odnosu na praćena kategorijalna obilježja (dob majki, ultrazvučna mjerenja ploda, težina ploda, fetoplacentarni omjer,  $\beta$ hCG, PaPP-A protein).

To se može tumačiti i drugim rezultatom ovog istraživanja u kojem smo utvrdili povećanu ekspresiju Ptch1 proteina u posteljicama iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta. Kako je Ptch1 inhibitor Smo rezultat je očekivan u posteljicama u kojima je došlo do poremećaja procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije kao ključnog procesa za urednu placentaciju. Potrebna su daljnja istraživanja o ulozi Smo proteina u Hh signalnom putu. Najvažniji među njima je identifikacija prirodnog Smo liganda i razumijevanje kako Ptch inhibira Smo. Ove će spoznaje poboljšati naše razumijevanje kanonskog signala, a vjerojatno će također otkriti nove aspekte nekanonskog signaliziranja. Do sada nije utvrđen njegov doprinos procesima razvoja niti je utvrđena njegova važnost u nastanku bolesti [47].

Općenito, smatra se da poremećena regulacija bilo koje komponente Hh signalnog puta dovodi do njegove aberantne aktivacije što može rezultirati zloćudnom preobrazbom. Prema najnovijim procjenama Hh signalni put sudjeluje u nastanku jedne trećine svih zloćudnih tumora, stoga postaje značajnom metom potencijalnih lijekova u terapiji raka [40]. Smo inhibitori predstavljaju ciljanu terapije za takve tumore u kojima mogu izazvati značajan odgovor. Njihova klinička primjena dovela je do pozitivnog pomaka u liječenju mnogih bolesnika s terminalnim i kemorezistentnim oblikom bazocelularnog karcinoma. Također ispituje se mogućnost njihove uporabe i u drugim vrstama tumora poput karcinoma gušterače ili meduloblastoma. Međutim, dugoročno liječenje Smo inhibitorima nije održivo jer su potencijalno toksični i zahtijevaju pri upotrebi oprezan i intenzivan nadzor, a postoje i dokazi o razvitku rezistencije na spomenute lijekove [115].

### **5.3 Ekspresija proteina survivina**

U ovom istraživanju analizirali smo ekspresiju survivina u posteljicama iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta i kontrolnim posteljicama iz urednih trudnoća.

Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u ekspresiji survivina u posteljicama iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta u odnosu na kontrolu. Nije bilo statistički značajne razlike u jačini ekspresije survivina u odnosu na analizirana kategorijalna obilježja (dob majki, ultrazvučna mjerenja ploda, težina ploda, fetoplacentarni omjer) dok za  $\beta$ hCG i PAPP-A protein nije učinjena analiza zbog malog broja ispitanica u skupini s nižim IIB.

Protein survivin je inhibitor apoptoze, mehanizma kojim stanica pokreće vlastitu smrt. Apoptoza je sastavni dio fizioloških procesa ili se javlja kao odgovor na različite patološke faktore. Normalno funkcioniranje procesa apoptoze bitan je dio pravilnog embrionalnog razvoja i održavanja stanične homeostaze. Survivin igra ulogu u zastoju rasta inhibirajući apoptozu koja gubi kontrolu u kasnijem tijeku trudnoće kada dolazi do prekomjernog odumiranja stanica trofoblasta i gubitka njihove funkcije.

To je u skladu s radom Straszewski-Chavez i suradnika koji su izvijestili da posteljica kao organ u razvoju prolazi stalno remodeliranje tkiva koje je karakterizirano gubitkom stanica trofoblasta apoptozom. Survivin kao protein inhibitor apoptoze inhibira aktivaciju kaspaze čime prekida daljnje širenje signala smrti [116].

Smith i suradnici su u svom istraživanju objavili da je incidencija apoptoze bila značajno viša u posteljicama iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta u usporedbi s normalnim posteljicama u trećem tromjesečju što je u skladu s našim rezultatom koji pokazuje da apoptoza igra značajnu ulogu u patofiziološkim mehanizmima zastoja fetalnog rasta [117].

Do sada nisu objavljeni drugi radovi koji istražuju ekspresiju survivina kao inhibitora apoptoze u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta.

Yamamoto i suradnici su u svom radu izvijestili da su mnoga istraživanja na kliničkim uzorcima pokazala su da je ekspresija survivina uvijek pojačana kod ljudskih karcinoma i povezana je s otpornošću na kemoterapiju ili terapiju zračenjem te lošom prognozom. Također je objavljeno da inhibicija survivina, sama ili u kombinaciji s drugim terapijama, inducira ili pojačava apoptozu u tumorskim stanicama, a da određeni antitumorski agensi mogu smanjiti ekspresiju survivina. Ova saznanja upućuju na potrebu istraživanja anti-survivin terapija u liječenju malignih bolesti [118].

#### **5.4 Ekspresija proteina cripto-1**

Sljedeće smo usporedili ekspresiju proteina cripto-1 u posteljicama iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta i posteljicama iz urednih trudnoća.

Nismo utvrdili značajnu statističku razliku u ekspresiji proteina cripto-1 između ovih skupina. Nije bilo statistički značajne razlike u jačini ekspresije cripto-1 u odnosu na analizirana kategorijalna obilježja (dob majki, ultrazvučna mjerenja ploda, težina ploda, fetoplacentarni omjer) dok za  $\beta$ hCG i PAPP-A protein nije učinjena analiza zbog malog broja ispitanica u skupini s nižim IIB.

Cripto-1 je najviše izražen tijekom ranog embrionalnog razvoja a slabije u posteljicama drugog i trećeg tromjesečja iz uredne trudnoće. Ovaj protein može na pozitivan ili negativan način modulirati različite intracelularne signalne putove. Dva glavna signalna puta koje aktivira cripto-1 su Nodal/Alk4/Alk7/Smad-2 signalni put i GRP78/Glypikan-1/c-src/MAPK/Akt signalni put. Nadalje, cripto-1 posredno djeluje i na neke druge signalne putove kao što su receptor tirozin kinaze erB4, Wnt/ $\beta$ -catenin, Notch i caveolin-1 što ukazuje na to da ima višestruku staničnu funkciju [119]. EMT ima ključnu ulogu tijekom embrionalnog razvoja. Gastrulacija je temeljni proces stvaranja tri zametna sloja: ektoderma, mezoderma i endoderma. Tijekom gastrulacije ektodermalne stanice prolaze kroz epitelno-mezenhimalnu tranziciju stvarajući primarni mezenhim odnosno prolazeći kroz mezenhimalno-epitelnu tranziciju stvaraju temeljni endoderm. Proteini obitelji TGF- $\beta$  kao što su Nodal, GDF1, GDF3 i njihovi koreceptori cripto-1, Wnt/ $\beta$ -catenin i FGF sudjeluju u koordinaciji regulacije morfogeneze tijekom gastrulacije. Poremećaj ekspresije cripto-1 može dovesti do poremećaja normalne EMT i MET regulacije stvaranja trofoblasta i aktivirati signalne puteve koji će dovesti do produženog trajanja i jačeg intenziteta invazije trofoblasta [120].

Bandeira i suradnici su izvijestili da je ekspresija cripto-1 bila značajno veća u uraslim posteljicama u odnosu na kontrolne posteljice te da jačina ekspresije prati dubinu urasle posteljice [121].

Do sada nisu objavljeni radovi koji analiziraju ekspresiju cripto-1 u terminskim posteljicama iz trudnoća kompliciranih sa zastojem fetalnog rasta. U ovom radu nismo našli statistički značajnu razliku u ekspresiji cripto-1 između terminskih posteljica s IUGR u odnosu na kontrolu što može ukazivati na to da je aktivnost cripto-1 u ovom slučaju potisnuta te da na taj način utječe na disregulaciji procesa EMT-a u ranoj trudnoći a što bi trebalo biti predmet budućih istraživanja.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da je ekspresija cripto-1 pojačana u različitim tumorima kod ljudi te staničnim linijama raka, a niske ili nedetektibilne razine ekspresije otkrivene su u normalnim tkivima odraslih i u netransformiranim normalnim staničnim linijama [122, 123]. Povećana ekspresija cripto-1 i smanjena ekspresija E-kadherina pozitivno su povezani s progresijom tumora i lošom prognozom u bolesnika s karcinomom želuca i dojke [122, 124].

Zhong i suradnici su u svom radu izvijestili da je povećana ekspresija cripto-1 i smanjena ekspresija E-kadherina povezana s progresijom tumora i lošom prognozom kod bolesnika s karcinomom želuca. Nadalje pojačana ekspresija cripto-1 je pozitivno korelirala s

prognostičkim čimbenicima kao što su veličina tumora, dubina invazije, metastaze u limfnim čvorovima i udaljenim organima. Istraživanje sugerira da bi kombinirana analiza cripto-1 i E-kadherina mogla imati ulogu u predviđanju ishoda te procjeni metastatskog potencijala raka želuca [122].

Gong i suradnici su u svom radu objavili da je pojačana ekspresija cripto-1 zabilježena u uznapređovalim karcinomima dojke s lošom prognozom u usporedbi s karcinomom dojke početnog stadija i s dobrom prognozom [124].

Istraživanja koja su dokazala pojačanu ekspresiju cripto-1 u embrionalnim matičnim stanicama i u stanicama tumora gdje potiče tumorogenezu, ukazuju na značajno mjesto proteina cripto-1 u budućim istraživanjima novih dijagnostičkih metoda i terapija kod različitih karcinoma.

### **5.5 Ekspresija proteina i preeklampsija**

U ovom istraživanju analizirali smo skupinu koju čine posteljice dobivene iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom te smo je usporedili s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta bez preeklampsije.

**Rezultati nisu pokazali značajnu statističku razliku u paritetu i spolu djece između posteljica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na prisutnost preeklampsije.** Učestalost preeklampsije je osam puta češća u žena koje su imale preeklampsiju u prethodnoj trudnoći, kao i kod prvorotki [125]. Intrauterini zastoj rasta, abrupcija posteljice i mrtvorodenje su posljedice insuficijencije posteljice, a s obzirom na uzajamnu uzročnu povezanost ovih stanja i preeklampsije možemo time objasniti rezultat našeg istraživanja.

**Nije utvrđena značajna statistička razlika u ekspresiji proteina Ptch1, survivina, cripto-1 i Smo između posteljica sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom u odnosu na skupinu posteljica sa zastojem fetalnog rasta bez preeklampsije.**

Takai i suradnici su u svom istraživanju objavili da aktivnost Shh puta snažno kolerira s ekspresijom Ptch1. Ekspresija Ptch1 i Gli2 bila je značajno niža u posteljicama s preeklampsijom u usporedbi s posteljicama iz urednih trudnoća. Ekspresija Ptch1 je bila izražena u citoplazmi citotrofoblasta i sinciciotrofoblasta, dok je Gli2 zapažen u jezgri viloznog trofoblasta. Istraživanje je pokazalo da je Shh put potisnut u posteljicama s preeklampsijom i da utječe na porođajnu težinu. U pokusima na miševima inhibirali su Shh put ciklopaminom što je smanjilo ekspresiju proteina Ptch1 i Gli2 u citotrofoblastu. Studija je pokazala da Shh put regulira IGF os kroz kanonski Shh-Gli put i kroz nekanonski SHH-ADCY-CREB put.

Pretpostavlja se da je nekanonski Shh-ADCY-CREB put ključni regulator IGF1R puta u posteljici te bi put Shh-IGF1R mogao biti cilj istraživanja novih terapija za poremećaje posteljice uključujući preeklampsiju i IUGR [126].

U ovom istraživanju smo uspoređivali posteljice s zastojem fetalnog rasta u odnosu na prisustvo preeklampsije a ekspresija proteina Ptch1, Smo, cripto-1 i survivina se nije razlikovala između ovih skupina što možemo objasniti činjenicom da su u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta, neovisno o preeklampsiji, drugi uzroci doveli do poremećaja EMT i zastoja rasta djelujući sličnim mehanizmima.

Ispitivana kategorijalna obilježja (tjedni trudnoće, UZV parametri /biparijetalni promjer, dužina bedrene kosti, opseg trbuha/, težina ploda,  $\beta$ hCG, PAPP-A) nisu pokazala značajnu statističku razliku između ispitivanih skupina u odnosu na preeklampsiju. Rezultati pokazuju da su i drugi uzroci uz preeklampsiju doveli do intrauterinog zastoja rasta.

## **5.6 Ekspresija proteina i patološki nalaz fetalnog Dopplera**

Sljedeće smo analizirali skupinu posteljica iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta s patološkim nalazom Dopplera u odnosu na skupinu posteljica sa zastojem fetalnog rasta i urednim nalazom Dopplera.

Ultrazvučna fetalna biometrija čini osnovu za otkrivanje poremećaja fetalnog rasta. Standardna ultrazvučna mjerenja fetusa u trudnoći uključuju mjerenje opsega glave, biparijetalnog promjera, opsega trbuha i duljine bedrene kosti. Težina fetusa procjenjuje se kombinacijom ova četiri parametra i korištenjem standardiziranih jednadžbi [127]. Patološki nalaz Dopplera u arterijama maternice, pupčane ili srednje moždane arterije ukazuje na disfunkciju posteljice kao temeljne etiologije IUGR. Nalaz Dopplera pupčane arterije može biti normalan u ranim stadijima IUGR te takav nalaz ne isključuje disfunkciju posteljice [128].

Kod ranog početka IUGR (<32 tjedna) povišen otpor Dopplera pupčane arterije prvi je korak do naknadno nastalih pogoršanja kardiovaskularnih i biofizičkih parametara s obzirom na to da je protok kroz pupčanu arteriju odraz vilozne cirkulacije koja je povezana s patologijom posteljice u ranom IUGR.

Kod IUGR-a s kasnim početkom ( $\geq 32$  tjedna) kardiovaskularno pogoršanje kao odgovor na fetalnu hipoksiju uglavnom je ograničeno na cerebralnu cirkulaciju [129, 130].

**Rezultati su pokazali granično značajnu statističku razliku za ekspresiju Smo proteina koji je bio više izražen u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i patološkim nalazom Dopplera.**

**Nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji Ptch1, cripto-1 i survivina u ispitivanim skupinama posteljica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na nalaz Dopplera.**

U našem istraživanju nismo dokazali povezanost ekspresije proteina Ptch1, cripto-1 i survivina uz graničnu povezanost ekspresije Smo u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i patološkim nalazom Dopplera koji procjenjuje hemodinamski aspekt disfunkcije posteljice.

**U ovom radu težina ploda se značajno statistički razlikovala između trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta s patološkim nalazom Dopplera** gdje je bila niža u odnosu na posteljice sa zastojem rasta i urednim Dopplerom. Nije utvrđena statistički značajna razlika u analiziranim kategorijalnim obilježjima (spol, paritet, UZV parametri /biparijetalni promjer, dužina bedrene kosti, opseg trbuha/, fetoplacentarni omjer,  $\beta$ hCG, PAPP-A) kod ispitanica u odnosu na nalaz Dopplera.

Naš rezultat možemo tumačiti na način da je manja težina ploda iz trudnoća sa zastojem fetalnog rasta i patološkim nalazom Dopplera odraz jače izražene patomorfoloških i cirkulacijskih promjene na posteljicama koje su se odrazile i na nalaz povišenog otpora u posteljičnim krvnim žilama što je očekivani rezultat.

Proctor i suradnici su objavili istraživanje koje pokazuje da su male posteljice na fetalnom ultrazvučnom pregledu, povišena razina alfa-fetoproteina (AFP) i niske razine PAPP-A mogu koristiti kao metode probira za teške oblike insuficijencije posteljice ako se mjere u drugom tromjesečju trudnoće [101]. Ograničenje našeg rezultata je i usporedba vrijednosti PAPP-a i  $\beta$ hCG mjerenih u drugom tromjesečju u odnosu na nalaz Dopplera koji je rađen u trećem tromjesečju trudnoće.

Miranda i suradnici su u svom radu izvijestili da se predviđanje IUGR-a na temelju rutinskog nalaza ultrazvuka u trećem tromjesečju trudnoće može poboljšati kombinacijom mjerenja težine ploda i dodatnim biomarkerima. Taj kombinirani model uključivao je karakteristike majke, procjenu težine ploda u trećem tromjesečju, Doppler posteljičnih krvnih žila te biokemijske markere (PIGF i estriol), a pokazao se učinkovitijim u otkrivanju IUGR u odnosu na samo procjenjivanje težine ploda [131].

## **5.7 Ekspresija proteina u odnosu na morfološke promjene posteljica iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta**

U ovom radu analizirali smo ekspresiju proteina Ptch1, Smo, survivin i cripto-1 u tkivu posteljica u odnosu na morfološke promjene posteljica iz trudnoća kompliciranih zastojem fetalnog rasta. Morfološke promjene posteljica sa zastojem rasta uključuju makroskopske i mikroskopske promjene na posteljici kao što su posteljična hipoplazija (težina posteljice manja od 10. centile za gestacijsku dob i/ili promjer pupkovine manji od 10. centile za gestacijsku dob), infarkt posteljice, retro i posteljična krvarenja te na mikroskopskoj razini deponiranje interviloznog fibrina, distalna vilozna hipoplazija, sincicijski čvorići, decidualna vaskulopatija i ubrzana zrelost resica.

U ovom istraživanju usporedbom nismo našli statistički značajnu razliku u ekspresiji proteina Ptch1, Smo, survivin i cripto-1 u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na patohistološke promjene tih posteljica.

Prema literature otprilike jedna četvrtina posteljice povezanih s IUGR nema nikakve morfološke abnormalnosti na rutinskom makroskopskom i histološkom pregledu [132]. Morfološke promjene koje se opisuju u posteljicama s IUGR mogu se naći i u trudnoćama koje nisu IUGR [133, 134].

Vedmedovska i suradnici su svom istraživanju pokazali da težina posteljice najbolje korelira s IUGR [135]. Međutim, Jakó i sur. predstavili su istraživanje u kojemu je mjeren volumen posteljice pokazao veću korelaciju s porođajnom težinom u usporedbi s vezom između težine posteljice i porođajne težine [136].

Iako postoji obrazac histoloških lezija posteljice koji ukazuje na neuspjeh migracije trofoblasta, ne postoje promjene koje su pouzdano povezane s kliničkom težinom IUGR. S tim u skladu su i naši rezultati koji nisu utvrdili značajnu povezanost ekspresije proteina koji sudjeluju u procesima EMT s određenim patohistološkim promjenama posteljica kompliciranih sa zastojem fetalnog rasta. Histološki nalazi posteljice s IUGR-om su različiti, od morfološki neupadljivih do nalaza teške uteroplacentarne vaskulopatije, a niti jedna patološka promjena nije povezane s visokom osjetljivošću ili specifičnošću s IUGR. To je dijelom zato što je stanje IUGR-a vjerojatno heterogeno, ali i zato što je opseg i distribucija bolesti u posteljici neravnomjerna i postoje tehnička i praktična ograničenja za metode rutinskog proučavanja ovog organa korištenjem velikog broja uzoraka.





## 6. ZAKLJUČAK

Analizom ekspresije proteina Ptch1, Smo, cripto-1 i survivina u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta došli smo do sljedećih zaključaka:

1. Ekspresija Ptch1 proteina statistički je značajno veća u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na posteljice iz zdravih terminskih trudnoća
2. Ekspresija Smo proteina u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta statistički se ne razlikuju u odnosu na posteljice iz zdravih terminskih trudnoća
3. Ekspresija proteina cripto-1 u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta statistički se ne razlikuje u odnosu na posteljice iz zdravih terminskih trudnoća
4. Ekspresija survivin proteina statistički je značajno veća u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na posteljice iz zdravih terminskih trudnoća
5. Ekspresija proteina Ptch1, Smo, cripto-1 i survivina u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i preeklampsijom se statistički ne razlikuje od ekspresije u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta bez preeklampsije.
6. Ekspresija Smo proteina je statistički granično veća u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i patološkim nalazom Dopplera u odnosu na posteljice sa zastojem fetalnog rasta i urednim nalazom Dopplera.
7. Ekspresija proteina Ptch1, cripto-1 i survivina nije se značajno statistički razlikovala između posteljica sa zastojem fetalnog rasta i patološkim nalazom Dopplera u odnosu na posteljice sa zastojem fetalnog rasta i uredan Doppler.
8. Ekspresija proteina Ptch1, Smo, cripto-1 i survivina u posteljicama sa zastojem fetalnog rasta nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na patohistološke promjene u tim posteljicama.

## 7. LITERATURA

1. Rai A, Cross JC. Development of hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. *Dev Biol.* 2014;387:131-41.
2. Maltepe E, Fisher SJ. Placenta: the forgotten organ. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2015;31:523-52.
3. Watson ED, Cross JC. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology.* 2005;20:180-93.
4. Soares JM, Varberg KM, Iqbal K. Hemochorial placentation: development, function, and adaptations. *Biol Reprod.* 2018;99(1):196-211.
5. Rai A, Cross JC. Development of hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. *Dev Biol.* 2014;387:131-41.
6. Larue L, Bellacosa A. Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene.* 2005;24:7443-54.
7. Ng YH, Zhu H, Leung PC. Twist modulates human trophoblastic cell invasion via regulation of N-cadherin. *Endocrinology.* 2012;153(2):925-36.
8. Serman A, Serman L. Development of placenta in a rodent-model for human placentation. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011;3:233-9.
9. Partl JZ, Fabijanovic D, Skrtic A, Vranic S, Martic TN, Serman L. Immunohistochemical expression of SFRP1 and SFRP3 proteins in normal and malignant reproductive tissues of rats and humans. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014;22:681-7.
10. DaSilva-Arnold SC, Zamudio S, Al-Khan A, et al. Human trophoblast epithelial-mesenchymal transition in abnormally invasive placenta. *Biol Reprod.* 2018;99(2):409-21.
11. Davies JE, Pollheimer J, Yong HE, et al. Epithelial-mesenchymal transition during extravillous trophoblast differentiation. *Cell Adh Migr.* 2016;10(3):310-21.
12. Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013;116:317-36.
13. Kos M, Leniček T. Osnove patologije posteljice. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. p. 32.
14. Lamouille L, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178-96.

15. Rangel MC, Karasawa H, Castro NP, Nagaoka T, Salomon DS, Bianco C. Role of Cripto-1 during epithelial-to-mesenchymal transition in development and cancer. *Am J Pathol.* 2012;180(6):2188-200.
16. Serman L, Nikuseva Martic T, Vranic S. T-cell factor 1 expression in germ cell tumors with trophoblastic differentiation. *Pathol Int.* 2014;64:86-7.
17. Davies JE, Pollheimer J, Yong HE, et al. Epithelial-mesenchymal transition during extravillous trophoblast differentiation. *Cell Adh Migr.* 2016;10:310-21.
18. Zheng H, Kang Y. Multilayer control of the EMT master regulators. *Oncogene.* 2014;33(14):1755-63.
19. Niewiadomski P, Kong JH, Ahrends R, et al. Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate Hedgehog signaling. *Cell Rep.* 2014;6(1):168-81.
20. Ma Y, Zhang P, Wang F, Yang J, Yang Z, Qin H. The relationship between early embryo development and tumourigenesis. *J Cell Mol Med.* 2010;14(12):2697-701.
21. Echelard Y, Epstein DJ, McMahon JA, McMahon AP. Sonic Hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell.* 1993;75:1417-30.
22. Pathi S, Pagan-Westphal S, Baker DP, et al. Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mech Dev.* 2001;106(1-2):107-17.
23. McMahon AP, Ingham PW, Tabn CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signalling. *Curr Top Dev Biol.* 2003;53:1-114.
24. Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF, Spohr TCLSE. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal.* 2018;16(1):11.
25. Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, et al. Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: its inhibition leads to growth suppression and apoptosis. *Cancer Sci.* 2007;98(1):68-76.
26. Choudhry Z, Rikani AA, Choudhry AM, et al. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Ann Neurosci.* 2014;21(1):28-31.
27. Stone DM, Murone M, Luoh S, et al. Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J Cell Sci.* 1999;112(Pt 23):4437-48.
28. Tukachinsky H, Lopez LV, Salic A. A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of SuFu-Gli protein complexes. *J Cell Biol.* 2010;191(2):415-28.

29. Méthot N, Basler K. Suppressor of fused opposes hedgehog signal transduction by impeding nuclear accumulation of the activator form of Cubitus interruptus. *Development*. 2000;127(18):4001-10.
30. Humke EW, Dorn KV, Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev*. 2010;24(7):670-82.
31. Ingham PW, Placzek M. Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet*. 2006;7(11):841-50.
32. Pusapati GV, Kong JH, Patel BB, et al. G protein-coupled receptors control the sensitivity of cells to the morphogen Sonic Hedgehog. *Sci Signal*. 2018;11(516):eaa05749.
33. Matissek SJ, Elswa SF. GLI3: a mediator of genetic diseases, development and cancer. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):54.
34. Li W, Ohlmeyer JT, Lane ME, Kalderon D. Function of protein kinase A in hedgehog signal transduction and *Drosophila* imaginal disc development. *Cell*. 1995;80(4):553-62.
35. Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell*. 2008;15(6):801-12.
36. Tang C, Mei L, Pan L, et al. Hedgehog signaling through GLI1 and GLI2 is required for epithelial-mesenchymal transition in human trophoblasts. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1850(7):1438-48.
37. Sabol M, Trnski D, Musani V, Ozretić P, Levanat S. Role of GLI transcription factors in pathogenesis and their potential as new therapeutic targets. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):2562.
38. Burling TB. The Hedgehog protein family. *Genome Biol*. 2008;9(11):241.
39. Chen Y, Jiang J. Decoding the phosphorylation code in Hedgehog signal transduction. *Cell Res*. 2013;23(2):186-200.
40. Murone M, Rosenthal A, de Sauvage FJ. Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. *Exp Cell Res*. 1999;253(1):25-33.
41. Choy SW, Cheng SH. Hedgehog signaling. *Vitam Horm*. 2012;88:1-23.
42. Smyth I, Narang MA, Evans T, et al. Isolation and characterization of human patched 2 (PTCH2), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Hum Mol Genet*. 1999;8(2):291-7.
43. Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, et al. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet*. 1998;18(3):231-6.

44. Qi X, Friedberg L, De Bose-Boyd R, Long T, Li X. Sterols in an intramolecular channel of Smoothened mediate Hedgehog signaling. *Nat Chem Biol.* 2020;16(12):1368-75.
45. Adolphe C, Nieuwenhuis E, Villani R, i sur. Patched 1 and patched 2 redundancy has a key role in regulating epidermal differentiation. *J Invest Dermatol.* 2014;134(7):1981-90.
46. Huang P, Zheng S, Wierbowski BM, i sur. Structural basis of Smoothened activation in Hedgehog signaling. *Cell.* 2018;174:312-24.
47. Arensdorf AM, Marada S, Ogden SK. Smoothened regulation: a tale of two signals. *Trends Pharmacol Sci.* 2016;37(1):62-72.
48. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* 2008;22(18):2454-72.
49. Sherbet GV. Chapter 6 – Hedgehog signalling in EMT, CSCs and angiogenesis. In: *Molecular approach to cancer management.* 2017. p. 55-64.
50. Jiang L, Wu X, Yan J, Chen R, Han Q, Zhang Q. Expression of Cripto-1 in the placenta and its role in placenta accreta and placenta previa. *Ginekol Pol.* 2019;90(2):86-92.
51. Philipp M, Caron MG. Hedgehog signaling: is Smo a G protein-coupled receptor? *Curr Biol.* 2009;19(3):R125-7.
52. Xue D, Ye L, Zheng J, i sur. The structure-based traceless specific fluorescence labeling of the Smoothened receptor. *Org Biomol Chem.* 2019;17(25):6136-42.
53. Strizzi L, Bianco C, Normanno N, et al. Cripto-1: a multifunctional modulator during embryogenesis and oncogenesis. *Oncogene.* 2005;24:5731-41.
54. Morkel M, Huelsken J, Wakamiya M, i sur. Beta-catenin regulates Cripto- and Wnt3-dependent gene expression programs in mouse axis and mesoderm formation. *Development.* 2003;130(25):6283-94.
55. Schier AF, Shen MM. Nodal signalling in vertebrate development. *Nature.* 2000;403:385-9.
56. Quail DF, Zhang G, Findlay SD, Hess DA, Postovit LM. Nodal promotes invasive phenotypes via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Oncogene.* 2014;33(4):461-73.
57. Strizzi L, Bianco C, Normanno N, i sur. Epithelial mesenchymal transition is a characteristic of hyperplasias and tumors in mammary gland from MMTV-Cripto-1 transgenic mice. *J Cell Physiol.* 2004;201(2):266-76.
58. Jiang L, Wu X, Yan J, Chen R, Han Q, Zhang Q. Expression of Cripto-1 in the placenta and its role in placenta accreta and placenta previa. *Ginekol Pol.* 2019;90(2):86-92.

59. Pan MH, Ju JQ, Li XH, i sur. Inhibition of survivin induces spindle disorganization, chromosome misalignment, and DNA damage during mouse embryo development. *Cell Cycle*. 2020;19(17):2148-57.
60. Pećina-Slaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int*. 2003;3(1):17.
61. Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, i sur. Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res*. 2000;60(13):3650-4.
62. Bianco C, Salomon DS. Human Cripto-1 as a target for a cancer vaccine: WO2008040759. *Expert Opin Ther Pat*. 2009;19(2):141-4.
63. Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(5):1087-98.
64. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, Survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997;3(8):917-21.
65. Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, i sur. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with Survivin function. *Nat Cell Biol*. 1999;1(8):461-6.
66. Song Z, Yao X, Wu M. Direct interaction between Survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of Survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2003;278(25):23130-40.
67. Mato E, González C, Moral A, i sur. ABCG2/BCRP gene expression is related to epithelial-mesenchymal transition inducer genes in a papillary thyroid carcinoma cell line (TPC-1). *J Mol Endocrinol*. 2014;52(3):289-300.
68. Vlčková K, Ondrušová L, Vachtenheim J, i sur. Survivin, a novel target of the Hedgehog/GLI signaling pathway in human tumor cells. *Cell Death Dis*. 2016;7(1):e2048.
69. Yilmaz N, Bakirci IT, Sahin B, Bolluk G, Can E, Dedeakayogullari H. Assessment of serum survivin in women with placenta previa and accreta spectrum: a cross-sectional study. *Sci Rep*. 2025;15:4735.
70. Johnson ME, Howerth EW. Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Vet Pathol*. 2004;41(6):599-607.
71. Fang XL, Cao XP, Xiao J, i sur. Overview of role of survivin in cancer: expression, regulation, functions, and its potential as a therapeutic target. *J Drug Target*. 2024;32:223-40.

72. Zur LR, Kingdom JC, Parks T, Hobson SR. The placental basis of fetal growth restriction. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2020;47:81-98.
73. Wu M, He J, Chen Y, i sur. Biomarkers for diagnosing and treating fetal growth restriction. *Curr Med Chem.* 2024;31:4461-78.
74. Peleg D, Kennedy CM, Hunter SK. Intrauterine growth restriction: identification and management. *Am Fam Physician.* 1998;58(2):453-60, 466-7.
75. Kuvačić I, Škrablin-Kučić S, ur. *Perinatologija danas.* Zagreb: Nakladni zavod Matice hrvatske; 2003.
76. Sharma D, Shastri S, Farahbakhsh N, Sharma P. Intrauterine growth restriction – part 1. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(24):3977-87.
77. Wardinger JE, Ambati S. Placental insufficiency. In: *StatPearls [Internet].* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. PMID: 33085318.
78. Sharma D, Sharma P, Shastri S. Genetic, metabolic and endocrine aspect of intrauterine growth restriction: an update. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017;30(19):2263-75.
79. Suhag A, Vincenzo B. Intrauterine growth restriction (IUGR): etiology and diagnosis. *Curr Obstet Gynecol Rep.* 2013;2:102-11.
80. Gordijn SJ, Beune IM, Thilaganathan B, i sur. Consensus definition of fetal growth restriction: a Delphi procedure. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016;48(3):333-9.
81. Easter SR, Eckert LO, Boghossian N, i sur. Fetal growth restriction: case definition and guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine.* 2017;35(48 Pt A):6546-54.
82. Kurjak A, Matijević R. *Fetalni rast.* U: Kurjak A, i sur, ur. *Ginekologija i perinatologija.* Varaždinske Toplice: Tonimir; 2003. p. 259-78.
83. Figueras F, Gratacos E. Update on the diagnosis and classification of fetal growth restriction and proposal of a stage-based management protocol. *Fetal Diagn Ther.* 2014;36(2):86-98.
84. Mifsud W, Sebire NJ. Placental pathology in early-onset and late-onset fetal growth restriction. *Fetal Diagn Ther.* 2014;36(2):117-28.
85. Aviram A, Sherman C, Kingdom J, Zaltz A, Barrett J, Melamed N. Defining early vs late fetal growth restriction by placental pathology. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2019;98(3):365-73.

86. Wadhwa PD, Buss C, Entringer S, Swanson JM. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin Reprod Med.* 2009;27:358-68.
87. Parks WT, Catov JM. The placenta as a window to maternal vascular health. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2020;47:17-28, 81-98.
88. Hea B, Hua Z, Zhou CY. First-trimester screening for fetal growth restriction using Doppler color flow analysis of the uterine artery and serum PAPP-A levels in unselected pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2020;12:1-5.
89. Lestari B, Fukushima T, Utomo RY, Wahyuningsih MSH. Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in placenta physiology and pathology. *Placenta.* 2024;151:37-47.
90. Mifsud W, Sebire NJ. Placental pathology in early-onset and late-onset fetal growth restriction. *Fetal Diagn Ther.* 2014;36:117-28.
91. Nelson DM, Myatt L. The human placenta in health and disease. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2020;47(1):15-8.
92. Melamed N, Yogev Y, Meizner I, Mashiach R, Bardin R, Ben-Haroush A. Sonographic fetal weight estimation: which model should be used? *J Ultrasound Med.* 2009;28(5):617-29.
93. Nahum GG, Stanislaw H. Ultrasonographic prediction of term birth weight: how accurate is it? *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188(2):566-73.
94. Ferrazzi E, Bozzo M, Rigano S, i sur. Temporal sequence of abnormal Doppler changes in the peripheral and central circulatory systems of the severely growth-restricted fetus. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002;19(2):140-6.
95. Cosmi E, Ambrosini G, D'Antona D, Saccardi C, Mari G. Doppler, cardiotocography, and biophysical profile changes in growth-restricted fetuses. *Obstet Gynecol.* 2005;106(6):1240-5.
96. Hecher K, Bilardo CM, Stigter RH, i sur. Monitoring of fetuses with intrauterine growth restriction: a longitudinal study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001;18(6):564-70.
97. Gaccioli F, Aye I, Sovio U, Charnock-Jones DS, Smith GCS. Screening for fetal growth restriction using fetal biometry combined with maternal biomarkers. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;218(2S):S725-37.
98. McCowan LM, Figueras F, Anderson NH. Evidence-based national guidelines for the management of suspected fetal growth restriction: comparison, consensus, and controversy. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;218(2S):S855-68.



99. Gaccioli F, Aye ILMH, Sovio U, Charnock-Jones S, Smith GCS. Screening for fetal growth restriction using fetal biometry combined with maternal biomarkers. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;218:S725-37.
100. Lacko LA, Massimiani M, Sones JL, i sur. Novel expression of EGFL7 in placental trophoblast and endothelial cells and its implication in preeclampsia. *Mech Dev.* 2014;133:163-76.
101. Proctor LK, Toal M, Keating S, i sur. Placental size and the prediction of severe early-onset intrauterine growth restriction in women with low pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;34(3):274-82.
102. Benn PA, Horne D, Briganti S, Rodis JF, Clive JM. Elevated second-trimester maternal serum hCG alone or in combination with elevated alpha-fetoprotein. *Obstet Gynecol.* 1996;87(2):217-22.
103. Smith GC, Crossley JA, Aitken DA, i sur. Circulating angiogenic factors in early pregnancy and the risk of preeclampsia, intrauterine growth restriction, spontaneous preterm birth, and stillbirth. *Obstet Gynecol.* 2007;109(6):1316-24.
104. Erez O, Romero R, Espinoza J, i sur. The change in concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in maternal plasma between the first and second trimesters in risk assessment for the subsequent development of preeclampsia and small-for-gestational age. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008;21(5):279-87.
105. Poon LC, Zaragoza E, Akolekar R, Anagnostopoulos E, Nicolaides KH. Maternal serum placental growth factor (PlGF) in small for gestational age pregnancy at 11+0 to 13+6 weeks of gestation. *Prenat Diagn.* 2008;28(12):1110-5.
106. Cowans NJ, Stamatopoulou A, Matwejew E, von Kaisenberg CS, Spencer K. First-trimester placental growth factor as a marker for hypertensive disorders and SGA. *Prenat Diagn.* 2010;30(6):565-70.
107. Lester SC. *Manual of surgical pathology.* 3rd ed. New York: Elsevier; 2010.
108. Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagn Pathol.* 2014;9:221.
109. Wang Q, Greene MI. Survivin as a therapeutic target for the treatment of human cancer. *Cancers.* 2024;16:1705.
110. Lees CC, Romero R, Stampalija T, i sur. Clinical opinion: the diagnosis and management of suspected fetal growth restriction: an evidence-based approach. *Am J Obstet Gynecol.* 2022;226:366-78.

111. Tsikouras P, Antsaklis P, Nikolettos K, i sur. Diagnosis, prevention, and management of fetal growth restriction (FGR). *J Pers Med*. 2024;14:698.
112. Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2000;92:35-43.
113. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-8.
114. Kottek L. Ekspresija proteina signalnog puta Hedgehog u humanim posteljicama [diplomski rad]. Osijek: Medicinski fakultet; 2018.
115. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: a comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci*. 2018;18(1):8-20.
116. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Mor G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr Rev*. 2005;26(7):877-97.
117. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 1997;117:401.
118. Yamamoto H, Ngan CY, Monden M. Cancer cells survive with survivin. *Cancer Sci*. 2008;99(9):1709-14.
119. Nagaoka T, Karasawa H, Castro NP, Rangel MC, Salomon DS, Bianco C. An evolving web of signaling networks regulated by Cripto-1. *Growth Factors*. 2012;30(1):13-21.
120. Morkel M, Huelsken J, Wakamiya M, i sur. Beta-catenin regulates Cripto- and Wnt3-dependent gene expression programs in mouse axis and mesoderm formation. *Development*. 2003;130(25):6283-94.
121. Bandeira CL, Urban Borbely A, Pulcineli Vieira Francisco R, i sur. Tumorigenic factor Cripto-1 is immunolocalized in extravillous cytotrophoblast in placenta creta. *Biomed Res Int*. 2014;2014:892856.
122. Zhong XY, Zhang LH, Jia SQ, i sur. Positive association of up-regulated Cripto-1 and down-regulated E-cadherin with tumour progression and poor prognosis in gastric cancer. *Histopathology*. 2008;52(5):560-8.
123. Normanno N, Qi C, Gullick W, i sur. Expression of amphiregulin, cripto-1, and heregulin-alpha in human breast-cancer cells. *Int J Oncol*. 1993;2(6):903-11.

124. Gong YP, Yarrow PM, Carmalt HL, i sur. Overexpression of Cripto and its prognostic significance in breast cancer: a study with long-term survival. *Eur J Surg Oncol.* 2007;33(4):438-43.
125. Bartsch E, Medcalf KE, Park AL, Ray JG. High risk of preeclampsia identification group. *BMJ.* 2016;353:i1753.
126. Takai H, Kondoh E, Mogami H, i sur. Placental sonic hedgehog pathway regulates foetal growth via insulin-like growth factor axis in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(8):3350-61.
127. Melamed N, Yogev Y, Meizner I, Mashiach R, Bardin R, Ben-Haroush A. Sonographic fetal weight estimation: which model should be used? *J Ultrasound Med.* 2009;28(5):617-29.
128. Baschat AA, Weiner CP. Umbilical artery Doppler screening for detection of the small fetus in need of antepartum surveillance. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(1 Pt 1):154-8.
129. Hecher K, Bilardo CM, Stigter RH, i sur. Monitoring of fetuses with intrauterine growth restriction: a longitudinal study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001;18(6):564-70.
130. Turan OM, Turan S, Gungor S, i sur. Progression of Doppler abnormalities in intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;32(2):160-7.
131. Miranda J, Rodriguez-Lopez M, Triunfo S, i sur. Prediction of fetal growth restriction using estimated fetal weight vs a combined screening model in the third trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017;50(5):603-11.
132. Fox H, Sebire NJ. Pathology of the placenta. 3rd ed. London: Saunders Elsevier; 2007. (Major problems in pathology).
133. Sağol S, Sağol O, Ozdemir N. Stereological quantification of placental villus vascularization and its relation to umbilical artery Doppler flow in intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn.* 2002;22:398-403.
134. Mayhew TM, Ohadike C, Baker PN, Crocker IP, Mitchell C, Ong SS. Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction. *Placenta.* 2003;24:219-26.
135. Vedmedovska N, Rezeberga D, Teibe U, Melderis I, Donders GG. Placental pathology in fetal growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;155(1):36-40.
136. Jakó M, Surányi A, Kaizer L, Németh G, Bártfai G. Maternal hematological parameters and placental and umbilical cord histopathology in intrauterine growth restriction. *Med Princ Pract.* 2019;28(2):101-8.

## 8. ILUSTRACIJE

### Popis slika

Slika 1. Grafički prikaz pariteta u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama

Slika 2. Grafički prikaz prema spolu djece u skupini sa zastojem fetalnog rasta i i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama

Slika 3. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za Ptch1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama

Slika 4. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Slika 5. Grafički prikaz vrijednosti imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na težinu ploda

Slika 6. Tkivo posteljice, imunohistokemijski obojeno na anti-Patched protutijelo (citoplazmatsko obojenje), povećanje 10x: a. negativno obojenje, b. obojenje intenziteta 1, c. obojenje intenziteta 2, d. obojenje intenziteta 3

Slika 7. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za Smo u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Slika 8. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Smo u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Slika 9. Tkivo posteljice, imunohistokemijski obojeno na anti-smoothened protutijelo (citoplazmatsko obojenje), povećanje 10x: a. negativno obojenje, b. obojenje intenziteta 1, c. obojenje intenziteta 2, d. obojenje intenziteta 3.

Slika 10. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za survivinu ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Slika 11. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za survivin u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Slika 12. Tkivo posteljice, imunohistokemijski obojeno na anti-survivin protutijelo (citoplazmatsko obojenje), povećanje 10x: a. negativno obojenje, b. obojenje intenziteta 1, c. obojenje intenziteta 2, d. obojenje intenziteta 3

Slika 13. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za *cripto-1* u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Slika 14. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za *cripto-1* u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Slika 15. Tkivo posteljice, imunohistokemijski obojeno na anti-*cripto* protutijelo (nuklearno i citoplazmatsko obojenje), povećanje 10x: a. negativno obojenje, b. obojenje intenziteta 1, c. obojenje intenziteta 2, d. obojenje intenziteta 3

Slika 16. Grafički prikaz pariteta u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na preeklampsiju

Slika 17. Grafički prikaz raspodjele prema spolu djece u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na prisustvo preeklampsije

Slika 18. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za *Ptch1* u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 19. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za *Ptch1* u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 20. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za *Smo* u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 21. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za *Smo* u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 22. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za *survivin* u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 23. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za *survivin* u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 24. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za *survivin* u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 25. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za *cripto-1* u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 26. Grafički prikaz trajanja trudnoće u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 27. Grafički prikaz veličine biparijetalnog promjera glave ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 28. Grafički prikaz dužine bedrene kosti ploda ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 29. Grafički prikaz opsega trbuha ploda ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 30. Grafički prikaz težine ploda ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 31. Grafički prikaz vrijednosti  $\beta$ hCG-a (IU/L) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 32. Grafički prikaz vrijednosti  $\beta$ hCG-a (MoM) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 33. Grafički prikaz vrijednosti PAPP-A (mIU/L) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 34. Grafički prikaz vrijednosti PAPP-A (MoM) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Slika 35. Grafički prikaz pariteta u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na nalaz Dopplera

Slika 36. Grafički prikaz raspodjele prema spolu djece u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na nalaz Dopplera

Slika 37. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za Ptch1 u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 38. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1 u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 39. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za Smo u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 40. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Smo u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 41. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za survivin u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 42. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za survivin u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 43. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije za cripto-1u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 44. Grafički prikaz imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za cripto-1 u ispitivanoj skupini s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 45. Grafički prikaz trajanja trudnoće u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 46. Grafički prikaz veličine biparijetalnog promjera glave ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 47. Grafički prikaz dužine bedrene kosti ploda ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 48. Grafički prikaz opsega trbuha ploda ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 49. Grafički prikaz težine ploda ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 50. Grafički prikaz fetoplacentarnom omjera u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 51. Grafički prikaz vrijednosti  $\beta$ hCG-a (IU/L) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 52. Grafički prikaz vrijednosti  $\beta$ hCG-a (MoM) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 53. Grafički prikaz vrijednosti PAPP-A (mIU/L) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta sa urednim i patološkim Dopplerom

Slika 54. Grafički prikaz vrijednosti PAPP-A (MoM) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Slika 55. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije IR i imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1, Smo, survivin i cripto-1 u ispitivanoj skupini posteljica s težinom <10. centile za gestacijsku dob

Slika 56. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije IR i imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1, Smo, survivin i cripto-1 u ispitivanoj skupini posteljica s infarktom u patohistološkom nalazu

Slika 57. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije IR i imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1, Smo, survivin i cripto-1 u ispitivanoj skupini posteljica s nalazom fibrinskih naslaga u patohistološkom nalazu

Slika 58. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije IR i imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1, Smo, survivin i cripto-1 u ispitivanoj skupini posteljica s nalazom sincicijskih čvorića u patohistološkom nalazu

Slika 59. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije IR i imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1, Smo, survivin i cripto-1 u ispitivanoj skupini posteljica s nalazom hematoma u patohistološkom nalazu

Slika 60. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije IR i imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1, Smo, survivin i cripto-1 u ispitivanoj skupini posteljica s nalazom kalcifikata u patohistološkom nalazu

Slika 61. Grafički prikaz intenziteta stanične reakcije IR i imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) za Ptch1, Smo, survivin i cripto-1 u ispitivanoj skupini posteljica s nalazom nezrelih korionskih resica u patohistološkom nalazu



## **Popis tablica**

Tablica 1. Podaci o izmjerenim kontinuiranim obilježjima u skupini sa zastojem fetalnog rasta (1) i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama (0)

Tablica 2. Prikaz pariteta u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini s urednom trudnoćom

Tablica 3. Prikaz spola djece u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalno rasta i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama

Tablica 4. Hi-kvadrat korelacijski test usporedbe pariteta i spola u skupini sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama

Tablica 5. Levene korelacijski test usporedbe tjedana trudnoće, težine ploda i dobi majke između ispitanica sa zastojem fetalnog rasa i kontrolne skupine s urednim trudnoćama

Tablica 6. Intenzitet stanične reakcije za Ptch1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Tablica 7. Intenzitet stanične reakcije za Ptch1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Tablica 8. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za Ptch1: 0-1 (nema reakcije), 2-3 (slabo izražen indeks bojanja), 4-8 (umjereno izražen indeks bojanja), 9-12 (jako izražen indeks bojanja)

Tablica 9. Imunohistokemijski indeks bojanja za Ptch1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama

Tablica 10. Hi-kvadrat korelacijski test usporedbe intenziteta reakcije i imunohistokemijskog indeksa bojanja za Ptch1 u skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Tablica 11. Levene test usporedbe kategorijalnih obilježja obzirom na imunohistokemijski indeks bojenja za Ptch1

Tablica 12. Intenzitet stanične reakcije za Smo u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Tablica 13. Intenzitet stanične reakcije za Smo u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Tablica 14. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za Smo: 0-1 (nema reakcije), 2-3 (slabo izražen indeks bojanja), 4-8 (umjereno izražen indeks bojanja), 9-12 (jako izražen indeks bojanja)

Tablica 15. Imunohistokemijski indeks bojanja za Smo u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama

Tablica 16. Hi-kvadrat korelacijski test usporedbe intenziteta reakcije i imunohistokemijskog indeksa bojanja za Smo u skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Tablica 17. Levene test usporedbe kategorijalnih obilježja obzirom na imunohistokemijski indeks bojenja za Smo

Tablica 18. Intenzitet stanične reakcije za survivin u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Tablica 19. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za survivin: 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja

Tablica 20. Hi-kvadrat korelacijski test usporedbe intenziteta reakcije i imunohistokemijskog indeksa bojanja za survivin u skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Tablica 21. Levene test usporedbe kategorijalnih obilježja obzirom na imunohistokemijski indeks bojenja za survivin

Tablica 22. Intenzitet stanične reakcije za cripto-1 u ispitivanoj skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Tablica 23. Intenzitet stanične reakcije za cripto-1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Tablica 24. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za cripto-1: 0=nema reakcije, 4=slabo izražen indeks bojanja, 8=umjereno izražen indeks bojanja, 12=jako izražen indeks bojanja

Tablica 25. Imunohistokemijski indeks bojanja za cripto-1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini s urednim trudnoćama

Tablica 26. Hi-kvadrat korelacijski test usporedbe intenziteta reakcije i imunohistokemijskog indeksa bojanja za cripto-1 u skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini posteljica iz urednih trudnoća

Tablica 27. Levene test usporedbe kategorijalnih obilježja obzirom na imunohistokemijski indeks bojenja za cripto-1

Tablica 28. Utvrđena preeklampsija u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini

Tablica 29. Prikaz pariteta u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na preeklampsiju

Tablica 30. Prikaz raspodjele prema spolu djece u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na prisustvo preeklampsije

Tablica 31. Intenzitet stanične reakcije za Ptch1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 32. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za Ptch1 u skupini sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 33. Intenzitet stanične reakcije za Smo u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 34. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za Smo u skupini sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije:

Tablica 35. Intenzitet stanične reakcije za survivin u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 36. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za survivin u skupini sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 37. Intenzitet stanične reakcije za cripto-1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 38. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za cripto-1 u skupini sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 39. Hi-kvadrat korelacijski test usporedbe pariteta, spola i ekspresije Ptch1, Smo, survivina i cripto-1 proteina u skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 40. Prikaz trajanja trudnoće u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 41. Prikaz veličine biparijetalnog promjera glave u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 42. Prikaz dužine bedrene kosti ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 43. Prikaz opsega trbuha ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 44. Prikaz težine ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 45. Prikaz vrijednosti  $\beta$ hCG-a (IU/L) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 46. Prikaz vrijednosti  $\beta$ hCG-a (MoM) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 47. Prikaz vrijednosti PAPP-A (mIU/L) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 48. Prikaz vrijednosti PAPP-A (MoM) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s i bez preeklampsije

Tablica 49. Levene korelacijski test usporedbe kategorijalnih obilježja

Tablica 50. Prikaz patološkog Dopplera u ispitivanoj skupini sa zastojem fetalnog rasta i kontrolnoj skupini

Tablica 51. Prikaz pariteta u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na nalaz Dopplera

Tablica 52. Prikaz raspodjele prema spolu djece u skupini ispitanica sa zastojem fetalnog rasta u odnosu na nalaz Dopplera

Tablica 53. Intenzitet stanične reakcije za Ptch1 u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim dopplerom

Tablica 54. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za Ptch1 u skupini sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Tablica 55. Intenzitet stanične reakcije za Smo u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim nalazom Dopplera

Tablica 56. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za Smo u skupini sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Tablica 57. Intenzitet stanične reakcije za survivin u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Tablica 58. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za survivin u skupini sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Tablica 59. Intenzitet stanične reakcije za cripto-1u ispitivanoj skupini s posteljicama sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Tablica 60. Imunohistokemijski indeks bojanja (IIB) za cripto-1 u skupini sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Tablica 61. Hi-kvadrat korelacijski test usporedbe pariteta, spola i ekspresije Ptch1, Smo, survivina i cripto-1 proteina u skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Tablica 62. Prikaza trajanja trudnoće u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Tablica 63. Prikaza veličine biparijetalnog promjera glave u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Tablica 64. Prikaz dužine bedrene kosti ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Tablica 65. Prikaz opsega trbuha ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Tablica 66. Prikaz težine ploda u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Tablica 67. Prikaz vrijednosti fetoplacentarnog omjera (fp) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Tablica 68. Prikaz vrijednosti  $\beta$ hCG-a (IU/L) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Tablica 69. Prikaz vrijednosti  $\beta$ hCG-a (MoM) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplera

Tablica 70. Prikaz vrijednosti PAPP-A (mIU/L) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Tablica 71. Prikaz vrijednosti PAPP-A (MoM) u ispitanica sa zastojem fetalnog rasta s urednim i patološkim Dopplerom

Tablica 72. Levene korelacijski test usporedbe kategorijalnih obilježja

Tablica 73. Hi-kvadrat korelacijski test usporedbe ekspresije Ptch1, Smo, survivina i cripto-1 proteina u skupini posteljica sa zastojem fetalnog rasta s pojedinim patohistološkim promjenama i bez njih

## 9. POPIS OZNAKA I KRATICA

AKT – obitelj serin/treonin protein kinaze

cAMP – ciklički adenzin monofosfat (*engl. cyclic adenosine monophosphate*)

CK1 – kazein kinaza 1 (*engl. casein-kinase-1*)

CTB – citotrofoblast

Dhh – protein hedgehog signalnog puta (*engl. desert hedgehog*)

EGF – epidermalni faktor rasta (*engl. epidermal growth factor*)

EVT – ekstravilozni trofoblast

EMT – epitelno-mezenhimalna tranzicija

ERK – kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (*engl. extracellular signal-regulated kinases*)

FGF – faktor rasta fibroblasta (*engl. fibroblast growth factor*)

Gli – onkogen povezan s gliomom (*engl. glioma-associated oncogene*)

GPCR – receptori na koje su vezani G-proteini (*engl. G-protein-coupled receptor*)

GRK2 – receptor kinaza 2 na koje su vezani G-proteini (*engl. G-protein-coupled receptor-kinase 2*)

hCG – humani korionski gonadotropin (*engl. human chorionic gonadotropin*)

HGF – faktor rasta hepatocita (*engl. hepatocyte growth factor*)

Hh – protein hedgehog signalnog puta (*engl. Hedgehog*)

IAP – inhibitori proteina apoptoze (*engl. inhibitor of apoptosis protein*)

Ihh – protein hedgehog signalnog puta (*engl. Indian hedgehog*)

IUGR – intrauterini zastoj rasta (*engl. intrauterine growth restriction*)

k-RAS – (*engl. Kirsten rat sarcoma viral proto-oncogene*)

MAPK – protein kinaza aktivirana mitogenom (*engl. mitogen-activated protein kinase*)

MET – mezenhimalno.epitelna tranzicija

Notch – transmembranski protein Notch (*engl. neurogenic locus notch homolog protein*)

PAPP-A – trudnički plazmatski protein A (*engl. pregnancy associated plasma protein A*)

PGF – posteljini faktor rasta (*engl. placental growth factor*)

PKA – protein kinaza A (*engl. Protein kinaza A*)

Ptch – protein hedgehog signalnog puta (*engl. Patched*)

PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza (*engl. phosphoinositide 3-kinase*)

RTK – receptorska tirozin kinaza

SGA – malen za gestacijsku dob (*engl. small for gestational age*)

Shh – protein hedgehog signalnog puta (*engl. sonic hedgehog*)

Snail2 – protein s motivom cinkovih prstiju Snail 2 (*engl. zinc finger protein Snail 2*)

Smo – protein hedgehog signalnog puta (*engl. smoothened*)

TGFβ – transformirajući faktor rasta beta 3 (*engl. transforming growth factor beta 3*)

TWIST2 – transkripcijski faktor (*engl. twist basic helix-loop-helix transcription factor 2*)

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta (*engl. vascular endothelial growth factor*)

Wnt – akronim skovan od gena vinske mušice Wingles i homolognog mišjeg gena int

## 10. ŽIVOTOPIS

Pavo Perković je završio Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 1998.godine. Pripravnički staž obavlja u Općoj Bolnici Varaždin te potom radi kao liječnik primarne zdravstvene zaštite u Domu zdravlja Varaždinske županije. Specijalističko usavršavanje iz područja ginekologije i opstetricije obavlja od 2002. do 2006. godine u Kliničkom bolničkom centru Zagreb te potom subspecijalističko usavršavanja iz ginekološke onkologije od 2013. do 2015. godine u istoj ustanovi. Od 2016. godine radi u Klinici za ženske bolesti i porode Kliničke bolnice Merkur u Zagrebu gdje obavlja dužnost voditelja Odjela za ginekološku onkologiju. Mentorirao je stručno usavršavanje liječnika iz područja ginekologije i opstetricije te ginekološke onkologije. Aktivno sudjeluje na brojnim domaćim i međunarodnim stručnim/znanstvenim skupovima.

Autor je i koautor sljedećih publikacija:

1. **Perković P**, Štifter-Vretenar S, Perković M, Štefančić M, Holjević E, Dekanić A, Štimac T. Survivin expression in placentas with intrauterine growth restriction. *Biomedicines*. 2025;13(7):1576
2. **Perković P**, Culej BD, Žunec BI, Lučić D, Duić Ž, Bursać D. Motherhood on a precarious path: Pregnancy following breast carcinoma – case report. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X*. 2024;23:100335-8
3. Perković M, Vukičević Lazarević V, **Perković P**, Perković T, Dolenec V, Hađak A, i sur. The role of interleukin-13 in chronic airway diseases: a cross-sectional study in COPD and asthma–COPD overlap. *Diseases*. 2025;13(9):287
4. Rahelić V, Perković T, Romić L, **Perković P**, Klobučar S, Pavić E, Rahelić D. The role of behavioral factors on chronic diseases – practice and knowledge gaps. *Healthcare (Basel)*. 2024;12(24):2520
5. Vince K, **Perković P**, Matijević R. What is known and what remains unresolved regarding gestational diabetes mellitus (GDM). *J Perinat Med*. 2020;48(8):757-63.
6. Vince K, **Perković P**, Matijević R. Doppler assessment of uteroplacental blood flow in screening for preeclampsia. *Ginekol Perinatol*. 2019;28(1-2):46-50.
7. **Perković P**, Vince K, Matijević R. Methotrexate therapy in gynecologic patients: four-year experience at a tertiary referral center. *Acta Med Croatica*. 2018;72(3):319-23.