

¹Klinika za ženske bolesti i porode Kliničkog bolničkog centra u Zagrebu,
²Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

UTJECAJ ČIMBENIKA ANGIOGENEZE NA RAZVOJ POSTELJICE

^{1,2}Josip Đelmiš i ¹Jozo Blajić

Pregledni članak

Ključne riječi: angiogeneza, angiostatin, endostatin, IGF-II, FGF-1, FGF-2, placenta, PIGF, VEGF, VEGFR-1, vaskulogeneza

SAŽETAK. U ovom preglednom članku detaljno je opisan utjecaj angiogenih i antiangiogenih čimbenika na razvoj posteljice. Razvoj posteljice u prvom tromjesečju trudnoće jedan je od glavnih činitelja o kojima ovisi daljnji tijek i ishod trudnoće. Čimbenici rasta endotela krvnih žila (VEGF) i rasta placente (PIGF) su ključni čimbenici i u fiziološkim i patološkim uvjetima. VEGF i PIGF ispoljavaju svoje djelovanje preko svojih receptora (tirozin kinaze) VEGFR-1 (Flt-1) i VEGFR-2 (KDR) koji se nalaze u endotelnim stanicama. Kisik je glavni regulator ravnoteže VEGF i PIGF. Hipoksija smanjuje djelovanje PIGF, a hiperoksija povećava. Topljivi VEGFR-1 (Flt-1) je povišen u trudnice koja će razviti preeklampsiju. Uspješna placentacija dovodi do niskog otpora krvnih žila zbog transformacije spiralnih arterija.

Razvoj posteljice u prvom tromjesečju trudnoće jedan je od glavnih činitelja o kojima ovisi daljnji tijek i ishod trudnoće (1). Prodiranje trofoblata u krvne žile majke započinje u spiralnim arterijama decidue u prvom tromjesečju trudnoće, a nastavlja se u ranom drugom tromjesečju trudnoće invazijom u radijalne arterije mišićnog sloja maternice (2). Ugradnjom stanica trofoblata u stijenku krvnih žila gubi se sposobnost reagiranja na neurovaskularne podražaje, a spiralne arterije ostaju trajno proširene, sniženog tonusa i otpora, što omogućava velik protok krvi od majke prema posteljici. Spiralne arterije koje nisu fiziološki promijenjene zbog slabijeg prodora trofoblata u njih, nisu sposobne odgovoriti na povišene potrebe protoka krvi u trudnoći. Ulazak stanica trofoblata u stijenku spiralnih arterija praćen je gubitkom elastičnih vlakana i stanica glatkog mišića, te porastom nakupina fibrina u stijenci tih krvnih žila. Tako iz spiralnih arterija malog promjera, visokog otpora i malog protoka krvi izvan trudnoće nastaju fiziološki promijenjene spiralne arterije povećanog promjera, smanjenog otpora i velikog protoka u trudnoći. Ove fiziološke promjene spiralnih arterija su posebice izražene u blizini intraviloznog prostora, gdje se promjer krvnih žila povećao pet do deset puta. Invazija spiralnih arterija u decidui dovršena je krajem prvog tromjesečja, a od dvanaestog do četrnaestog tjedna trudnoće nastavlja se invazija citotrofoblata u radijalne arterije u unutrašnjoj trećini mišićnog sloja stijenke maternice.

Placenta stvara nekoliko čimbenika rasta koji su poznati kao potentni čimbenici angiogeneze.

Čimbenici koji sudjeluju u razvoju krvnih žila resica su: Fibroblastni čimbenici rasta (FGF-1 i FGF-2; engl. *Fibroblast growth factor*) koji stimuliraju proliferaciju stanica i invazivnost izvanresičnog citotrofoblata mijenjajući aktivnost aktivatora plazminogena te djeluju na vazomotornu funkciju povećanjem sinteze dušičnog oksida (NO). U prvom tromjesečju trudnoće nastaju u citotrofoblastu resica i u izvanresičnom invazivnom citotrofoblastu, a FGF-2 i u sinciciotrofoblastu.

U zrejoj placenti FGF-1 nastaje u sinciciotrofoblastu, Hofbauerovim stanicama i u glatkim mišićnim stanicama medije većih krvnih žila, a FGF-2 u endotelnim i mišićnim stanicama krvnih žila. Za sintezu vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF) odgovoran je gen na 6. kromosomu. Mutacija gena odgovorna za stvaranje receptora za VEGF (VEGFR) uzrokuje izostanak vaskulogeneze i hematopoeze u mezodermu stijenke žumanjčane vreće. VEGF nakon što se veže za receptor ima dvostruko djelovanje: stimulira mitozu stanice i aktivira enzim NOS (engl. *nitric oxide synthase*) za izlučivanje dušičnog oksida (NO). U prvom tromjesečju trudnoće VEGF nastaje u sinciciotrofoblastu, stanicama strome, endotelu krvnih žila, decidualnim stanicama i u izvanresičnom citotrofoblastu. U zrejoj placenti sintetiziraju ga samo sinciciotrofoblast i izvanresični citotrofoblast. Za sintezu placentarnog čimbenika rasta (PIGF; engl. *placental growth factor*) odgovoran je gen na 14. kromosomu. Tijekom trudnoće koncentracija ovog čimbenika povećava se u majčinoj krvi, a smanjuje u amniotskoj tekućini. PIGF nastaje u sinciciotrofoblastu, u citotrofoblastu, u endotelu i u mediji krvnih žila resica te u decidualnim stanicama. Hipoksija uzrokuje porast koncentracije VEGF-a (*Vascular endothelial growth factor*), a smanjeno izlučivanje PIGF-a. Hepatocitni čimbenik rasta (HGF; engl. *Hepatocyte growth factor*) stimulira rast stanica trofoblata parakrinim djelovanjem. Sintetiziraju ga stanice sinciciotrofoblata, perivaskularni miofibroblasti i endotel krvnih žila resica.

Humani angiogenin je polipeptid koji tijekom angiogeneze sudjeluje u proliferaciji i formiranju novih krvnih kapilara. Rajashekhar i suradnici (3) su ga dokazali u korionskim resicama već u prvom tromjesečju trudnoće, a pred kraj trudnoće njegova je količina dvostruko veća.

Diferencijacija i razvitak fetoplacentarnih krvnih žila rezultat su vaskulogeneze i angiogeneze, dok je prilagodba spiralnih arterija posljedica angiogeneze. Uskla-

divanje ovih razvojnih procesa pod nadzorom je obitelji lokalno djelujućih angiogenih čimbenika rasta kao što su placentni (PIGF), vaskularni endotelni (VEGF), angiopoetin (Ang-1) i njihovi receptori. Ostali poticajni angiogeni čimbenici identificirani u posteljici su FGF (engl. *Fibroblast growth factors*) i hepatocitni faktor rasta (HGF), PDGF (engl. *Platelet-derived growth factor*), IGF (engl. *Insulin-like growth factor*), TGF- α i - β (engl. *Transforming growth factor*), IL-8 (1,22,46). Antiangiogena svojstva pokazuju Ang-2, angiostatin, endostatin, interferon α , β i γ i LIF (engl. *Leukemia inhibitory factor*) (4).

Ang-1 i VEGF sinergistički stimuliraju angiogenezu. VEGF utječe na proliferaciju fetoplacentarnog krvožilja, a angiopoetini koji su dominantni u drugoj polovici trudnoće značajni su za organizaciju i stabilizaciju majčinih endotelnih stanica i pericita. Nedostatak Ang-1 manifestira se kardiovaskularnim oštećenjem. Primarna funkcija Ang-2 je vaskularna regresija. Najviše ga ima oko desetog tjedna trudnoće u majčinim endotelnim stanicama (5,6,7). Bazični fibroblastni čimbenik rasta (bFGF; engl. *Basic fibroblast growth factor*) je vjerojatno najznačajniji ovarijski angiogeni čimbenik. Izoliran je prvotno iz tumorskih stanica, secerniraju ga trofoblast i endotelne stanice korijalnih resica (8). Čimbenici rasta nakon vezanja za odgovarajuće receptore na staničnoj površini započinju staničnu fosforilacijsku kaskadu čiji rezultat je aktivacija mitogenih protein kinaza (9).

Čimbenik rasta endotela krvnih žila (VEGF) i čimbenik rasta placente (PIGF) su ključni čimbenici i u fiziološkim i patološkim uvjetima. VEGF ispoljava svoje djelovanje preko svojih receptora (tirozin kinaze) VEGFR-1/Flt-1 i VEGFR-2/KDR koji se nalaze u endotelnim stanicama (10).

U ljudskoj placenti istraživana je ekspresija VEGF *in situ* hibridizaciji i imunohistokemijskim istraživanjima. VEGF je lokaliziran na trofoblastu i makrofazima fetalnog i maternalnoga porijekla. PIGF pokazuje 53% sličnosti s VEGF-om, a izoliran je iz medije većih krvnih žila posteljice (11,12). Dva receptora VEGFR-1/Flt-1 i VEGFR-2/KDR se smatraju da su specifični za endotel. Vezivanjem PGF-a na VEGFR-1/Flt-1 dolazi do stvaranja nigranajuće angiogeneze. Koncentracija VEGF-a i VEGFR-2/KDR je visoka u ranoj trudnoći i smanjuje se trajanjem trudnoće, dok se koncentracija PGF-a i VEGFR-1/Flt-1 povećava trajanjem trudnoće. VEGF i VEGFR-2/KDR su uključeni u prva dva tromjesečja trudnoće u nastajanju bogate granajuće kapilarne mreže od mezenhimalnih i nezrelih resica, dok PIGF i VEGFR-1/Flt-1 su uključeni u stvaranju dugih slabo granajućih terminalnih kapilara u trećem tromjesečju. VEGF stimulira ekstravazaciju tekućine i proteina i otpušta dušični oksid (NO).

Utjecaj kisika na razvoj placentalnih krvnih žila. Kisik je glavni regulator ravnoteže VEGF-a i PGF-a (11). Hipoksija povećava djelovanje VEGF-a, a hiperoksija smanjuje. Uspješna placentalacija dovodi do niskog otpora krvnih žila zbog transformacije spiralnih

arterija. Rani razvoj placente nastaje u uvjetima hipoksije, što dovodi do stimulacije proliferacije citotrofoblasta, a inhibira invaziju sinciotrofoblasta. Pravi protok krvi se uspostavlja između 10.–12. tjedna trudnoće. Povećava se pO_2 dolazi do invazije trofoblasta i do promjena spiralnih arterija, što dovodi do smanjenja otpora u placenti. Opisuju se tri različita tipa hipoksije (13, 14):

1. **Preplacentarna hipoksija.** Majka, placenta i fetus su hipoksični. Nastaje kod anemije majke i srčanih bolesti majke. U uvjetima preplacentarne hipoksije dolazi do nastanka granajuće angiogeneze sa stvaranjem kratkih terminalnih resica.
2. **Uteroplacenta hipoksija.** Oksigenacija majke je uredna, ali zbog oštećenja uteroplacentne cirkulacije placenta i fetus su hipoksični kao u pre eklampsiji s održanim dijastoličkim protokom. U ovim uvjetima periferne placentalne resice slično pokazuju stvaranje bogato grananje, a fetalni protok je uredan ili smanjen. U tim uvjetima se povećava koncentracija VEGF-a, a smanjuje PIGF-a.
3. **Postplacentalna hipoksija.** Fetus je hipoksičan, majka je dobro oksigenirana, placenta pokazuje viši pO_2 od normale. U ovim uvjetima terminalne kapilare se slabije razvijaju nedostaje grananje kapilara što dovodi do povišenja otpora. Perinatalni mortalitet je visok, a preživjela novorođenčad razvijaju neurorazvojna oštećenja. U ovim uvjetima koncentracija PIGF-a je povišena, a VEGF-a je smanjena što ukazuje na rano započetu hiperoksiju. Postplacentalna hipoksija rezultira dominirajućim djelovanjem PIGF-a u ranoj trudnoći, smanjenjem razvoja granajuće angiogeneze i reduciranim stvaranjem terminalnih resica.

Vaskularni endotelni faktori rasta (VEGF) i njihovi receptori VEGFR-1/Flt-1 i VEGFR-2/KDR su specifični mitogeni za vaskularni endotel jer ostali angiogeni čimbenici, IGF-I i PDGF-a npr., potiču samo fibroblastnu proliferaciju (15,16,17). Opisan je sinergistički utjecaj VEGF-a i bFGF-a u angiogenezi (4). *In vitro* istraživanja dokazuju da će inhibicija bFGF-a, bez obzira na odgovarajuću koncentraciju VEGF-a i njegovih receptora, zbog povećane apoptoze spriječiti angiogenezu (8). VEGF stabilizira novostvorene kapilare arterijskog, venskog i limfatičnog porijekla indukcijom antiapoptoičkih proteina Bel-2 i A1 (4,7). VEGF potiče koagulaciju učinkom na tkivni i von Willebrandov faktor u endotelnim stanicama i monocitima. Povećava stvaranje aktivatora plazminogena i metaloproteinaza, važnih u razgradnji izvanstanične tvari, što olakšava angiogenezu. U kontroli procesa sudjeluju inhibitori aktivatora plazminogena također stimulirani VEGF-om, koji smanjuju adheziju i migraciju endotelnih stanica, a povećavaju apoptozu (8). VEGF potiče kemotaksiju monocita (18), inhibira sazrijevanje dendritičnih stanica koje u imunološkom sustavu domaćina prepoznaju strane antigene i na taj način olakšava širenje tumora (18). Angiogeneza ovisna o VEGF-u kod enhondralne osifikacije ostvaruje se putem VEGF receptora VEGFR-1/

Flt-1 na osteoblastima (19). Ostali utjecaji VEGF-a na staničnoj razini su povećanje transporta glukoze i mobilizacija intracelularnog kalcija (19). Pokusima na štakorima nakon intravenske primjene VEGF-a dokazana je o dozi ovisna vazodilatacija, prolazna tahikardija, hipotenzija i smanjenje srčanog udarnog volumena. Ti učinci su postignuti stimulacijom sinteze dušičnog oksida u endotelnim stanicama (19). Stvoreni dušični oksid može pozitivnom povratnom spregom povećati ekspresiju VEGF-a i bFGF-a, ali je i negativnom povratnom spregom smanjiti (20).

Povišene serumske vrijednosti VEGF-a kod žena koje razviju hiperstimulacijski sindrom posljedica su stimulacije ovulacije humanim korionskim gonadotropinom (hCG-om) (21). Steroidni hormoni utječu na ekspresiju VEGF-a in vivo i in vitro. I drugi hormoni, poput inzulina, kortikotropina i tireotropina, potiču lučenje VEGF-a (22). Nastanak VEGF-a također je povećan u fiziološkim stanjima s povećanom angiogenezom (menstruacijski ciklus, cijeljenje rane), ali i nekim bolestima (endometrioza, grozdasta potajnica, reumatoidni artritis, dijabetična retinopatija, tumori jajnika, maternice i dojke (23). Von Hippel-Lindau tumorski supresorski faktor smanjuje ekspresiju gena osjetljivih na hipoksiju, uključujući i gen za VEGF (24).

Receptori za VEGF

Afinitet za vezanje VEGF-a je zabilježen u hemangioblastima žumanjčane vreće (19). Obitelj VEGF-a veže se za tri različita tirozin kinaze receptora: Flt-1 (VEGFR-1), KDR/Flk (VEGFR-2) i Flt-4 (VEGFR-3). Visoko su specifični za vaskularni endotel, a nađeni su u posteljici i mišićju maternice (25). Inaktivacija gena za VEGFR-1/Flt-1 i VEGFR-2/KDR kod miša rezultira smrću embrija između osmog i devetog dana. Kod nedostatka VEGFR-1/Flt-1 ne dolazi do razvoja krvnih žila, a zbog nedostatka VEGFR-2/KDR-a izostaje diferencijacija hemangioblasta u endotelnim stanicama (20, 26,27). VEGFR-1/Flt-1 se veže za aminokiselinske ostatke negativnog, a VEGFR-2/KDR pozitivnog naboja (4).

VEGFR-1 ili Flt-1 (engl. *Fms-like-tyrosine kinase*) ima molekulsku masu 180 kDa. Nalazi se u endotelu korijalne resice, izvanresičastom trofoblastu i Hofbauerovim stanicama (28,29,30). Najznačajniji utjecaj Flt-1 je oblikovanje endotela u ranim fazama razvitka (30). Migracija monocita kod upale i širenja tumorskih stanica zbog oslabljenog imunološkog odgovora domaćina uvjetovani su Flt-1 receptorom (31). Sposobnost vezanja VEGF za VEGFR-1 (Flt-1) deset puta je veća od afiniteta za VEGFR-2 (KDR) (32) ali je tirozinska fosforilacija slabija (6,33,34,35). Nazočnost Flt-1 receptora u humanom amniju i decidui na mjestu prsnuća ovoja bacaju novo svjetlo na ulogu VEGF-a majčinskog ili fetalnoga podrijetla kod preranog, ali i terminskog porođaja. Porast Flt-1 se javlja neovisno o korioamnionitisu, iako upala pojačava ekspresiju (36). VEGFR-2 (KDR/Flk-1) je glikozirani protein molekularne težine

230 kDa koji je prisutan na endotelu i decidui (37). Flk-1 (engl. *Fetal liver kinase-1*) ima 85% strukturne sličnosti s humanim analogom KDR (*kinase domain region*) (38). Vezanje za KDR omogućava mitogeni učinak VEGF-a na vaskularni endotel i regulaciju angiogeneze u embrionalnom, ali i odraslom tkivu (39,40). *In vitro*, hipoksija stimulira ekspresiju Flt-1, ali ne i KDR receptora (19). *In vivo*, dolazi do povećanja Flt-1 i Flk-1/KDR gena u srčanim krvnim žilama kod miokardijalnog infarkta i u ishemičnim regijama glioblastoma. S obzirom da Flt-1, ali ne i KDR, imaju vezno mjesto za HIF-1 α (engl. *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*), pretpostavka je da porast KDR-a nastaje indirektno, parakrinom stimulacijom iz ishemičnog tkiva (26). Koncentracije Flt-1 i Flk-1/KDR-a su kod habitualnih pobačaja snižene u decidualnom endotelu, ali ne i u posteljici (41). Pokusi na mišjim embrijima pokazali su da postojanje samo transmembranske i izvanstanične (topljive) regije Flt-1 ne ometa njihov razvitak, što znači da citoplazmatska tirozin-kinaza nije važna za endotelnu diferencijaciju i angiogenezu (35). Ta istraživanja upućuju da je Flt-1 samo inertna «zamka» za VEGF koja sprječava vezanje za moćniji VEGFR-2 (35). Drugi autori opovrgavaju takva tumačenja dokazujući da Flt-1 ima dvije biološke funkcije: inducira tkivni faktor aktivatora plazminogena u monocitima i endotelnim stanicama i utječe na kemotaksiju monocita (42,43). U razvitku kolateralne cirkulacije nakon začepljenja krvnih žila od presudnog je značaja aktivacija monocita koji invadiraju stijenku krvne žile, oslobađaju proteaze i čimbenike rasta i započinju i/ili usmjeravaju proces preoblikovanja (44). Poticajni učinci VEGF-a na aktivatore i inhibitore plazminogena ostvareni su preko Flt-1 receptora. VEGFR-3 (Flt-4) ima molekulsku masu 195 kDa. Prisutan je na limfnim žilama, a veže VEGF-C i -D. Nedostatak Flt-4 dovodi do nakupljanja tekućine iz propusnih krvnih žila i rezultira smrću mišjeg embrija u drugoj polovici trudnoće (45).

Topljivi VEGFR-1/Flt-1 (sVEGFR-1/sFlt-1) je molekulske mase 110 kDa izoliran je iz endotelnih stanica pupčane vene. Sadrži samo izvanstanični dio molekule, bez sedme petlje slične imunoglobulinu (46,47). Topljivi receptor uglavnom stvara inaktivne komplekse s VEGF-om i VEGFR-2, a samo se 5–10% može detektirati u formi slobodnog proteina (34). Zbog inhibicije mitogene i proliferativne aktivnosti endotelnih stanica, sFlt-1 je fiziološki regulator angiogeneze (35). Osim endotelnih, trofoblastne i decidualne stanice, a zatim i monociti i dendriti stvaraju sFlt-1. Topljivi Flt-1 (sVEGFR-1) pokazuje visok afinitet za heparin (35). Izolacija mRNA za sFlt-1 iz uzoraka tkiva bubrega, nadbubrežne žlijezde, aorte i pulmonalne arterije dokaz je da postoji lokalna regulacija aktivnosti VEGF-a i u odraslom organizmu (48). Sekrecija sFlt-1 povećava se u trudnoći prateći masu posteljice (49). U mišjoj posteljici Flt-1 je prisutan jedanaestog dana trudnoće. Od trinaestog dana mišje trudnoće koncentracija sFlt-1 postupno raste, a sedamnaestog dana Flt-1 nestaje. Organi u razvitku poput posteljice osobito su osjetljivi na rav-

notežu spomenutih receptora (48). Amnijska tekućina sadrži visoke koncentracije sFlt-1, nepoznatog porijekla, koji u normalnim uvjetima neutralizira VEGF i/ili PlGF (35). U kulturi posteljičnih stanica, hipoksija potiče sekreciju sFlt-1, a hiperoksija djeluje inhibitory. Topljivi Flt-1 je povišen u trudnice koja će razviti preklampsiju (50). Poznat je još jedan prirodni inhibitor VEGF-a, α 2-makroglobulin, serumski protein važan za održavanje žutog tijela (51). U postupcima potpomognute oplodnje, sniženje α 2-makroglobulina upozorava na rizik nastanka hiperstimulacije (21). Izoliran je i topljivi oblik VEGFR-2 (sVEGFR-2), koji ne pokazuje svojstvo inhibicije mitogene aktivnosti (4).

Tie-1 i Tie-2 receptori

Još jedna receptorska obitelj specifična za vaskularni endotel uključuje Tie-1 (engl. *Tunica interna endothelial cell kinase*) i Tie-2. Nedostatak im se očituje u smanjenju broja endotelnih stanica, degeneraciji endokarda, edemu i krvarenjima (41). U embriogenezi se javljaju nakon VEGFR-1/Flt-1 i VEGFR-2/KDR receptora, ali prije von Willebrandova faktora koji obilježava zreli endotel (31). Osim u fetalnim i majčinskim krvnim žilama Tie-1 i -2 receptora ima i u trofoblastu (31). Kod habitualnih pobačaja manje su prisutni u posteljici i decidualnom endotelu (52). Povećana ekspresija Tie-1 i Tie-2 se nalazi kod fiziološke i patološke angiogeneze (maturacije folikula u jajniku, cijeljenja rane i tumorske angiogeneze) (5).

Receptor za Tie-1 je nepoznat. Ang-1 je receptor za Tie-2, a Ang-2 je prirodni Tie-2 antagonist (53).

Neutropilin-1 (NP-1) i neutropilin-2 (NP-2)

Poznat je još jedan receptor za VEGF-A, -B, -E i PlGF-2, a to je neutropilin-1 (NP-1) netirozinski receptor s kratkom citoplazmatskom i dugačkom izvanstaničnom domenom (34). Početni otkriveni značaj NP-1 odnosio se na provođenje neuralnih impulsa u aksonu. Nedavno je dokazano da njegov nedostatak ili prekomjerna ekspresija uzrokuju oštećenu vaskularizaciju žumanjčane vreće i anomalije velikih krvnih žila i srca. U fetalnom srcu je NP-1 prisutan zajedno s VEGFR-1 u koronarnim krvnim žilama, a s VEGFR-1 i -2 u kapilarima endo- i miokarda. Istodobna ekspresija NP-1 i VEGFR-2 četverostruko povećava vezanje VEGF (47). Ta činjenica ukazuje da je NP-1 vjerojatno koreceptor za VEGFR-2/KDR, a ne funkcionalni receptor.

Inzulinu slični faktori rasta (IGF)

Obitelj dva peptida IGF-1 i IGF-2 imaju važnu ulogu za rast i funkciju placente (54). Placenta stvara IGF-1 i IGF-2. IGF-2 je 1000 puta viši u placenti od IGF-1 (55). Svoju biološku aktivnost IGF-1 i IGF-2 ispoljavaju preko svojih specifičnih proteina IGFBP (engl. *Insulin-like growth factor-binding protein*), kojih ima šest (55). IGFBP-1 utječu na aktivnost IGF-a na staničnoj razini preko nekoliko mehanizama. Produžuju život IGF-a u

serumu, a do sada neobjašnjenim mehanizmom povećavaju ili smanjuju djelovanje IGF-a na staničnoj razini.

Snabdijevanje ploda putem placente osnovnim supstratima kao što su kisik i prehranbene tvari s jedne strane određuje, izravno i neizravno, maksimum do kojega fetus može rasti, a s druge strane održava već formirana tkiva. Ograničena prehrana majke također mijenja i strukturu placente. Ograničena prehrana majke smanjuje placentu, uslijed čega dolazi do zaostajanja u rastu ploda i smanjenog kapaciteta razmjene tvari. Osim toga, ograničenje prehrane majke prouzročit će i druge promjene u strukturi placente, što dodatno podupire pretpostavku o reduciranoj funkciji razmjene supstrata. Među tim promjenama zabilježena je povećana debljina sinciciotrofoblasta kao i smanjena ukupna površina za razmjenu tvari. Ograničena prehrana majke mijenja i razinu cirkulirajućih IGF-a. Točnije, koncentracija IGF-I, IGF-II i IGFBP-3 u plazmi se smanjuje dok IGFBP-2 raste (56). U skladu s poznatom ulogom IGF-II u olakšavanju prodiranja citotrofoblasta u deciduu i u njezine krvne žile u početnoj trudnoći (57), a reducirani cirkulirajući IGF-II majke u sredini trudnoće, povezan je sa smanjenom težinom fetusa kao i sa smanjenom površinom sinciciotrofoblasta te s povećanom debljinom sinciciotrofoblasta (58). U trećem tromjesečju trudnoće, smanjen omjer IGF-II, IGFBP-2, povezani su sa smanjenom težinom placente odnosno fetusa, što upućuje na postojanje interakcije između čimbenika rasta i vezujućih proteina u razdoblju placentarnog razvoja. S druge strane, majčin cirkulirajući IGF-I povezan je s razvojem placente u kasnijoj trudnoći. Smanjene vrijednosti cirkulirajućeg IGF-I i njegova glavnog prenositelja IGFBP-3, kao i redukcija IGFBP-1 u krvi majke, povezani su sa smanjenom količinom trofoblasta i smanjenom prokrvljenosti placente, uslijed čega je pred kraj trudnoće difuzija dodatno otežana (59). Ovi nalazi su u skladu s pretpostavkom da IGF-II u krvi majke pospješuje rast placente i diferencijaciju trofoblasta u prvoj polovici trudnoće kada trofoblast prodire u deciduu, dok IGF-I i modulacija njegove raspoloživosti (zahvaljujući snabdijevanju putem IGFBP-1 i -3) mogu utjecati na razvoj placentne strukture tijekom druge polovice trudnoće, osobito u slučajevima kada je prehrana ograničena. Julie Owens (60) istraživala je o posljedicama placentne restrikcije na razinu fetalnog IGF i na rast fetusa. Endokrini odgovor fetusa na obilje supstrata u njegovu okruženju djelomično odražava djelovanje snabdjevenosti supstratima na rast fetusa i njegov metabolizam. Među glavnim anaboličkim hormonima zaduženim za rast *in utero* su i inzulinu slični čimbenici rasta (IGF), inzulin i tiroksin, dok su glavni katabolički hormoni kateholamini i kortizol. U ovaca, redukcija placentnog čimbenika rasta smanjuje transport kisika, glukoze i amino kiselina fetusu, a što je odraz kataboličkog stanja (60). Davanjem IGF-I fetusu ovce sa zastojem u rastu normalizira se razina cirkulirajućeg IGF-I i povećava se i/ili obnavlja rast i sazrijevanje nekih mekih tkiva te skeleta. Ovaj nalaz je u skladu s nalazom da reducirana količina IGF-a ima zna-

čajnu ulogu u usporavanju rasta i razvoja ploda (61). Nasuprot tome, razine cirkulirajućeg IGF-II, kojega ima u većim količinama u fetusa ovaca sa zastojem u rastu ostaju nepromijenjene kroz duže vrijeme, tj. sve do 127 dana trudnoće, kada razina kortizola u krvi fetusa počinje ubrzano rasti (62). Ovo upućuje na činjenicu da smanjena raspoloživost IGF-II može doprinijeti usporavanju fetalnog rasta, no tek potkraj trudnoće.

Pokazano je da su razine cirkulirajućeg IGF-I u fetusa regulirane koncentracijama glukoze i inzulina, neovisno od tih istih koncentracija u majke (63). Fetalni odgovor na pothranjenost također je paralelan s odgovorom majke: smanjuje se razina cirkulirajućeg IGF-I i IGFBP-3, a povećava se razina IGFBP-1 i IGFBP-2 (64). Ovaj je nalaz u skladu s posredničkom ulogom IGF-I u regulaciji fetalnog rasta u kasnoj trudnoći. Infuzije relativno visokih doza IGF-I (30–50 mg/kg/h) korištene su da bi se utvrdili mehanizmi s pomoću kojih bi IGF-I mogao regulirati fetalni rast. Infuzija IGF-I u fetusa povećava fetalnu apsorpciju glukoze i amino kiselina iz placente i inhibira placentnu produkciju laktata (65). Nasuprot tome, infuzija u majke povećava placentnu apsorpciju glukoze i amino kiselina iz cirkulacije majke i pospješuje placentnu produkciju laktata (66). Stoga Harding zaključuje da razlika između razina IGF-I u maternalnoj i fetalnoj cirkulaciji regulira distribuciju hranjivih tvari između majke, placente i fetusa. Istraživanja su pokazala da je IGF-I važan i u regulaciji distribucije hranjivih tvari unutar samog fetusa. Infuzija IGF-I inhibira kako apsorpciju tako i oksidaciju serina u tijelu, a da pri tom ne mijenja ukupnu fetalnu apsorpciju ili oksidaciju serina (67).

Literatura

1. Watson, AJ. The cell biology of blastocyst development. *Med. Reprod Dev.* 1992;33:492–504.
2. Graham CH, Lala PK. Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control. *Biochem Cell Biol.* 1992;70:867–874.
3. Rajashekhar G, Loganath A, Roy AC, Wong YC. Expression and localization of angiogenin in placenta: enhanced levels at term over first trimester villi. *Mol Reprod Dev* 2002;62:159–66.
4. Ferrara N, Davis-Smith T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18:4–25.
5. Wulff C, Wilson H, Dickson SE, Wiegand SJ, Fraser HM. Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod* 2002;66:802–812.
6. Reynolds LP, Redmer DA. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod* 2001;64(4):1033–1040.
7. Anthony RV, Limesand SW, Jeckel KM. Transcriptional regulation in the placenta during normal and compromised fetal growth. *Biochem Soc Trans* 2001;29:42–48.
8. Mandriota SJ, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J Cell Sci* 1997;110:2293–2302.
9. Khaliq A, Foreman D, Ahmed A, Weich H, Gregor Z, McLeod D, Boulton M. Increased expression of placenta growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Lab Invest* 1998;78(1):109–116.
10. Neufeld G, Tessler S, Gitay-Goren H, Cohen T, Keshet E. Vascular endothelial growth factors and its receptors. *Prog Growth Factor Res.* 1994;5:89–97.
11. Bosio PM, Wheeler T, Anthony F, Conroy R, O’Herlihy C, McKenna P. Angiogenesis and placental growth in normal and compromised pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184:146–52.
12. Khaliq A, Shams M, Li XF, Sisi P, Acevedo CA, Weich HA, White MJ, Ahmed A. Localization of placental growth factor (PlGF) in human term placenta. *Growth Factors.* 1996;13:243–250.
13. Ahmed A, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of Placental Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Placenta Growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by Oxygen – A Review. *Placenta.* 2000;21 (suppl A);14:S16–S24.
14. Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM, Fisher SJ. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models placental defects that occur in preeclampsia. *J Clin Invest.* 1996;97:540–550.
15. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999;77:527–543.
16. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669–676.
17. Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:561–569.
18. Clauss M, Weich H, Breier G. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. *J Biol Chem* 1996;271:17629–17634.
19. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:1358–1366.
20. Joško J, Gwozdz B, Jedrzejowska-Szypulka H, Hendryk S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit* 2000;6:1047–1052.
21. McElhinney B, Ardill J, Caldwell C, Lloyd F, McClure N. Ovarian hyperstimulation syndrome and assisted reproductive technologies: why some and not others? *Hum Reprod* 2002;17:1548–1553.
22. Jelkmann W. Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clinical Chemistry* 2001;47:617–623.
23. Gordon JD, SHifren JL, Foulk RA, Taylor RN, Jaffe RB. Angiogenesis in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Surv* 1995;50:688–697.
24. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 1999;114:853–865.
25. Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:561–569.
26. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. *J Biol Chem* 1997;272:23659–23667.
27. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376:62–66.

28. Athanassiades A, Hamilton GS, Lala PK. Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol Reprod* 1998;59:643–654.
29. Shibuya M, Ito N, Claesson-Welsh L. Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and-2. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:59–83.
30. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1994;269:26988–26995.
31. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocytemacrophages in humans. *Blood* 2001;97:785–791.
32. Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:324–328.
33. Wulff C, Wilson H, Dickson SE, Wiegand SJ, Fraser HM. Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod* 2002;66:802–12.
34. Migdal M, Huppertz B, Tessler S, Comforti A, Shibuya M, Reich R, Baumann H, Neufeld G. Neuropilin-1 is a placenta growth factor -2 receptor. *J Biol Chem* 1998;273:22272–22278.
35. Hornig C, Barleon B, Ahmad S, Vourela P, Ahmed A, Weich HA. Release and complex formation of soluble VEGFR-1 from endothelial cells and biological fluids. *Lab Invest* 1996;80:443–454.
36. Daneshmand SS, Ramen HC, Moore TR, Bogic L. Preterm premature rupture of membranes: Vascular endothelial growth factor and its association with histologic chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:1131–1136.
37. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodorowicz D, Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187:1579–1586.
38. Vourela P. Vascular endothelial growth factor, its receptors, and the Tie receptor in normal and complicated pregnancy. (Doktorska dizertacija). Helsinki: Medicinski fakultet, 2000.
39. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NPH, Risau W, Ulrich A. High affinity binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72:835–846.
40. Ahmed A, Perkins J. Angiogenesis and intrauterine growth restriction. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000;14:981–998.
41. Vourela P, Carpen O, Tulppala M, Halmesmaki E. VEGF, its receptors and the Tie receptors in recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 2000;6:276–282.
42. Ziche M, Maglione D, Ribatti D, Morbidelli L, Lago TC, Battisti M, Paoletti I, Barra A, Tucci M, Parise G, Vincenti V, Granger HJ, Viglietto G, Persico MG. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic and angiogenic. *Lab Invest* 1997;76:517–531.
43. Barleon B, Sozzani S, Zhou F, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor Flt-1. *Blood* 1996;87:3336–3343.
44. Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, Weich H, Fernandez B, Golomb G, Carmeliet P, Schaper W, Clauss M. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic. *Circ Res* 2003;92:378–385.
45. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. Cardiovascular ailure in mouse embryos deficient in VEGF receptor 3. *Science* 1998;282:946–949.
46. Clark DE, Smith SK, He Y. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod* 1998; 59:1540–48.
47. Banks R, Forbes M, Searles J. Evidence for the existence of a novel pregnancy associated soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:377–386.
48. Hornig C, Behn T, Bartsch W, Yayon A, Weich HA. Detection and quantification of complexed and free soluble human vascular endothelial growth factor receptor-1 (sVEGFR-1) by ELISA. *J Immunol Methods* 1999;226:169–177.
49. He Y, Smith SK, Day KA, Clark DE, Licence DR, Charnock-Jones DS. Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGFR-1) (Flt-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol Endocrinol* 1999;13:537–545.
50. Clark DE, Smith SK, Licence D, Evans AL, Charnock-Jones DS. Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *J Endocrinol* 1998;159:459–467.
51. McKeeman GC, Ardill JE, Caldwell CM, Hunter AJ, McClure N. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) is increased throughout gestation in patients who have preeclampsia develop. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191(4): 1240–1246.
52. Soker S, Svajm CM, Neufeld G. Vascular endothelial growth factor is inactivated by binding to α 2-macroglobulin and the binding is inhibited by heparin. *J Biol Chem* 1993;268: 7685–7691.
53. Banks R, Forbes M, Searles J. Evidence for the existence of a novel pregnancy associated soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1. *Mol Hum Reprod* 1998;4:377–386.
54. Anthony RV, Limesand SW, Jeckel KM. Transcriptional regulation in the placenta during normal and compromised fetal growth. *Biochem Soc Trans* 2001; 29:42–48.
55. Sara VR, Hall K. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev*. 1990; 70:591–614
56. Fant M, Munro H, Moses AC. An autocrine/paracrine role for insulin-like growth factors in the regulation of human placental growth. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986; 63:499–505.
57. Sohlstrom A, Katsman A, Kind KL, Roberts CT, Owens PC, Robinson JS, Owens JA. Food restriction alters pregnancy-associated changes in IGF and IGFBP in the guinea pig. *Am J Physiol* 1998; 274:E410–E416.
58. Hamilton GS, Lysiak JJ, Han VK, Lala PK. Autocrine-paracrine regulation of human trophoblast invasiveness by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1. *Exp Cell Res*. 1998; 244:147–156.
59. Roberts CT, Sohlstrom A, Kind KL, Grant PA, Earl RA, Robinson JS, Khong TY, Owens PC, Owens JA. Altered placental structure induced by maternal food restriction in guinea pigs: a role for circulating IGF-II and IGFBP-2 in the mother? *Placenta*. 2001; 22:S77–S82.

60. Roberts CT, Kind KL, Earl RA, Grant PA, Robinson JS, Sohlstrom A, Owens PC, Owens JA. Circulating Insulin-like Growth Factor (IGF)-1 and IGF Binding Proteins-1 and -3 and Placental Development in the Guinea-pig. *Placenta*. 2002;23:763–770.
61. Owens JA, Kind KL, Carbone F, Robinson JS, Owens PC. Circulating insulin-like growth factors-1 and-2 and substrates in fetal sheep following restriction of placental growth. *J Endocrinol*. 1994; 140:5–13.
62. Lok F, Owens JA, Mundy L, Robinson JS, Owens PC. Insulin-like growth factor 1 promotes growth selectively in fetal sheep in late gestation. *Am J Physiol*. 1996; 270:R1148–R1155.
63. Philips ID, Simonetta G, Owens JA, Robinson JS, Clarke IJ, McMillen IC. Placental restriction alters the functional development of the pituitary-adrenal axis in the sheep fetus during late gestation. *Pediatr Res*. 1996; 40:861–886.
64. Oliver MH, Harding JE, Breier BH, Gluckman PD. Fetal insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II are regulated differently by glucose or insulin in the sheep fetus. *Reprod Fertil Dev*. 1996; 8:167–172.
65. Gallaher BW, Oliver MH, Eichhorn K, Kiess W, Harding JE, Gluckman PD, Breier BH. Circulating insulin-like growth factor II/mannose-6-phosphate receptor and insulin-like growth factor binding proteins in fetal sheep plasma are regulated by glucose and insulin. *Eur J Endocrinol*. 1994; 131:398–404.
66. Harding JE, Liu L, Evans PC, Gluckman PD. Insulin-like growth factor I alters fetal-placental protein and carbohydrate metabolism in fetal sheep. *Endocrinol*. 1994; 134:1509–1514.
67. Liu L, Harding JE, Evans PC, Gluckman PD. Maternal insulin like growth factor I infusion alters fetoplacental carbohydrate and protein metabolism in pregnant sheep. *Endocrinol*. 1994; 135:895–90.
68. Jensen EC, van Zijl P, Evans PC, Harding JE. Effect of IGF-I on serine metabolism in fetal sheep. *J Endocrinol*. 2000; 165:261–269.

Adresa autora: Prof. dr. sc. Josip Đelmiš, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Šalata 3, 10000 Zagreb, *e-pošta:* josip.djelmis@zg.t-com.hr

¹Department of Obstetrics and Gynecology University Hospital Center Zagreb,
²School of Medicine University of Zagreb

IMPACT OF ANGIOGENIC FACTORS ON THE PLACENTAL DEVELOPMENT

^{1,2}Josip Đelmiš i ¹Jozo Blajić

Pregledni članak

Key words: angiogenesis, angiostatin, endostatin, IGF-II, FGF-2, placenta, PIGF, VEGF, VEGFR-1, vasculogenesis

SUMMARY. This review article brings into the focus the impact of angiogenic and antiangiogenic factors on placental development. Development of the placenta in the first trimester of pregnancy is one of the main factors on which the further course and outcome of pregnancy depend. Factors of vascular endothelial growth (VEGF) and placental growth (PIGF) are key factors in both physiological and pathological conditions. VEGF and PIGF exert their activity through their receptor (tyrosine kinase) VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (KDR), located in endothelial cells. Oxygen is the principal regulator of the balance of VEGF and PIGF. Hypoxia reduces the action of PIGF, and hyperoxia increases. Soluble VEGFR-1 (Flt-1) is elevated in pregnant women who will develop preeclampsia. Successful placentation leads to low resistance in the blood vessels due to the transformation of the spiral arteries.