

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Janko B. Legner

**ZNAČAJ GALEKTINA-8 ZA PROCES
PLACENTACIJE I NJEGOVA EKSPRESIJA U
ĆELIJAMA HORIOKARCINOMA I TKIVU
PLACENTI PACIJENTKINJA SA
PREEKLAMPSIJOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Janko B. Legner

**THE SIGNIFICANCE OF GALECTIN-8 FOR
THE PLACENTATION PROCESS AND ITS
EXPRESSION IN CHORIOCARCINOMA CELLS
AND PLACENTAL TISSUE OF PATIENTS
WITH PREECLAMPSIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

Mentori

dr Milica Jovanović Krivokuća, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za primenu nuklearne energije, INEP

dr Milica Markelić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi komisije

dr Žanka Bojić-Trbojević, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za primenu nuklearne energije, INEP

dr Ksenija Veličković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Nataša Karadžov Orlić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

dr Jelena Trajković, docent
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Datum odbrane:

Izjava zahvalnosti

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije sproveden je u Odeljenju za biologiju reprodukcije na Institutu za primenu nuklearne energije – INEP. Ovaj rad ne bi bio moguć bez podrške i pomoći brojnih ljudi, kojima dugujem iskrenu i duboku zahvalnost.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj mentorki sa instituta, dr Milici Jovanović Krivokuća, koja je nesebično uložila ogromnu energiju i trud u moje usmeravanje i obuku. Njena posvećenost u prenošenju znanja, strpljenje u objašnjavanju eksperimentalnih postupaka, kao i dragoceni saveti u analizi rezultata, ostavili su dubok trag na mom istraživačkom razvoju. Pored toga, njena podrška u procesu objavljivanja naučnih radova i pisanju disertacije bila je od ključnog značaja, a njeno strpljenje i razumevanje tokom svih ovih godina predstavljali su stalni oslonac.

Mentorki sa fakulteta, dr Milici Markelić, izražavam iskrenu zahvalnost za stalnu dostupnost, pružene informacije i podršku. Njena pomoć je bila naročito dragocena tokom završne faze doktorata. Njena brižljivost i predanost u ispravljanju i usavršavanju teze značajno su doprinele njenoj vrednosti.

Zahvaljujem se i dr Žanki Bojić-Trbojević, čiji je trud, znanje i savetodavna uloga bila od velike pomoći u obuci, interpretaciji rezultata i rešavanju brojnih nedoumica. Svojom posvećenošću eksperimentalnim pitanjima i oblikovanju teze, dala je dragocen doprinos kvalitetu istraživanja. Takođe želim da izrazim svoju iskrenu zahvalnost ostalim članovima komisije: dr Kseniji Veličković, dr Nataši Karadžov Orlić i dr Jeleni Trajković, koje su svojim sugestijama doprinele unapređenju kvaliteta ove teze.

Takođe, želeo bih da izrazim zahvalnost i svim kolegama sa instituta i odeljenja, koji su svojim znanjem, iskustvom i spremnošću da pomognu doprineli uspešnoj realizaciji eksperimentalnog dela istraživanja. Njihove sugestije i praktična pomoć bili su od neprocenjivog značaja u svakodnevnom radu.

Duboku zahvalnost dugujem i svojoj supruzi, koja je svojim nesebičnim angažovanjem, razumevanjem i neprekidnom podrškom omogućila da istrajem u ovom dugom i zahtevnom procesu. Pomenuo bih i svoju decu, koja su bila moj neiscrpan izvor snage i podsećala me da se svaki izazov može savladati kada postoji ljubav koja inspiriše. Na kraju, želeo bih da izrazim zahvalnost svojim roditeljima i bratu, jer su mi kroz život pružali dragocene savete, otvorili vrata novim prilikama i, što je možda najvažnije, darovali mi slobodu da samostalno biram svoj put.

Sažetak

Tokom trudnoće placenta je ključni organ za rast fetusa. Citotrofoblastne ćelije diferenciraju se u vilusne i ekstravilusne trofoblastne (EVT) ćelije. U ranoj trudnoći, EVT vrše invaziju u stromu i spiralne arterije uterusa, čime omogućavaju povećan protok krvi neophodan za razvoj fetusa. Ovaj proces regulišu brojni signali, uključujući galektine – proteine uključene u ćelijsku signalizaciju, imunitet, inflamaciju i patologije. Za više galektina pokazano je da učestvuju u implantaciji embriona i razvoju placente. Galektin-8 je prisutan u EVT ćelijama, ali njegova uloga u ranoj trudnoći nije bila istražena.

Cilj ove disertacije bio je da se ispita uloga galektina-8 u funkcionalnim svojstvima normalnih EVT ćelija, kao i njegova ekspresija u ćelijama horiokarcinoma (JAR, JEG-3) i placentama iz trudnoća komplikovanih preeklampsijom. Kao model zdravih EVT ćelija korišćena je linija HTR-8/SVneo. Ispitivan je uticaj rekombinantnog humanog galektina-8 i utišavanja gena *LGALS8* pomoću siRNK.

Rezultati su pokazali da galektin-8 ne utiče na vijabilnost ćelija, ali smanjuje procenat ćelija u G2/M fazi, što ukazuje na moguću ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa. Tretman galektinom-8 povećao je adheziju, migraciju i invaziju EVT ćelija, uz porast aktivnosti MMP-2 i MMP-9. Suprotno tome, utišavanje *LGALS8* smanjilo je ove sposobnosti i aktivnost MMP-9. Uočeno je i blago smanjenje integrina $\alpha 1$ nakon utišavanja gena.

Ekspresija galektina-8 bila je viša u HTR-8/SVneo nego u JAR i JEG-3 ćelijama, uz razlike u molekulskim formama. U placentama sa preeklampsijom, zabeležena je varijabilna ekspresija, pa zbog malog broja uzoraka nije moguće doneti pouzdan zaključak.

Rezultati ukazuju da galektin-8 ima važnu ulogu u invaziji trofoblasta tokom rane trudnoće, moguću povezanost sa malignom transformacijom trofoblasta, dok njegova uloga u preeklampsiji zahteva dalja istraživanja.

Ključne reči: Galektin-8, placenta, ekstravilusni trofoblast, horiokarcinom, preeklampsija, integrini, matriksne metaloproteinaze

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija reprodukcije

Abstract

During pregnancy, the placenta is a key organ for fetal growth. Cytotrophoblastic cells differentiate into villous and extravillous trophoblast (EVT) cells. In early pregnancy, EVT cells invade the stroma and spiral arteries of the uterus, enabling increased blood flow necessary for fetal development. This process is regulated by numerous signals, including galectins – proteins involved in cell signaling, immunity, inflammation and pathology. Several galectins have been shown to participate in embryo implantation and placental development. Galectin-8 is present in EVT cells, but its role in early pregnancy has not been investigated.

The aim of this dissertation was to examine the role of galectin-8 in the functional properties of normal EVT cells, as well as its expression in choriocarcinoma cells (JAR, JEG-3) and placentas from pregnancies complicated by preeclampsia. The HTR-8/SVneo cell line was used as a model of healthy EVT cells. The effect of recombinant human galectin-8 and silencing of the *LGALS8* gene using siRNA was investigated.

The results showed that galectin-8 does not affect cell viability, but reduces the percentage of cells in the G2/M phase, which indicates a possible role in cell cycle regulation. Treatment with galectin-8 increased adhesion, migration and invasion of EVT cells, along with elevated activity of MMP-2 and MMP-9. Conversely, silencing *LGALS8* reduced these capabilities and decreased MMP-9 activity. A slight decrease in integrin $\alpha 1$ expression was also observed after gene silencing.

Galectin-8 expression was higher in HTR-8/SVneo cells than in JAR and JEG-3 cells, with differences in molecular forms. In placentas with preeclampsia, variable expression was observed. However, due to the small sample size, no reliable conclusion could be drawn.

These results indicate that galectin-8 plays an important role in trophoblast invasion during early pregnancy and may be associated with malignant transformation of trophoblasts, while its role in preeclampsia requires further investigation.

Key words: Galectin-8, placenta, extravillous trophoblast, choriocarcinoma, preeclampsia, integrins, matrix metalloproteinases

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biology of reproduction

SKRAĆENICE

ANOVA – Analiza varijanse (eng. *Analysis of Variance*)

BCA – Bicinhoninska kiselina (eng. *Bicinchoninic Acid*)

BSA - albumin iz goveđeg seruma (eng. *Bovine Serum Albumin*)

CAD-11 – kadherin-11 (eng. *Cadherin-11*)

CBB – Kumasi briljantno plava (eng. *Coomassie Brilliant Blue*)

CD9 – klaster diferencijacije 9 (eng. *Cluster of Differentiation 9*)

cDNK - komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina

CRD – Domen prepoznavanja ugljenih hidrata (eng. *Carbohydrate Recognition Domain*)

CTB – Citotrofoblast

CV – kristal ljubičasta (eng. *Crystal Violet*)

DAB – 3,3'-Diaminobenzidin

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM/F12 – Dulbecco-va modifikacija Eagle-ovog medijuma sa Ham-ovom hranljivom smešom

DNK – Dezoksiribonukleinska kiselina

ECL – Pojačana hemiluminescencija (eng. *Enhanced Chemiluminescence*)

ECM – ekstracelularni matriks (eng. *Extracellular Matrix*)

EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina

eEVT – endovaskularni ekstravilusni trofoblast

EGF – epidermalni faktor rasta (eng. *Epidermal Growth Factor*)

EGFR – epidermalni receptor za faktor rasta (eng. *Epidermal Growth Factor Receptor*)

ELISA – enzimski imunosorbentni test (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EMT – epitelo-mezenhimska tranzicija (eng. *Epithelial-Mesenchymal Transition*)

EVT – ekstravilusni trofoblast

FAK – kinaza fokalnih adhezija (eng. *Focal Adhesion Kinase*)

FCS – fetalni teleći serum (eng. *Fetal Calf Serum*)

GTB – Gestacijske trofoblastne bolesti

HM – Hidatidiformna mola

HRP – peroksidaza rena (eng. *Horseradish Peroxidase*)

HTR-8/SVneo - ekstravilusna trofoblastna ćelijska linija čoveka

IL - interleukin

IGF-2 – insulinu-sličan faktor rasta-2 (eng. *Insulin-like Growth Factor 2*)

IGFBP-1 – insulinu-sličan faktor rasta vezujući protein-1 (eng. *Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1*)

iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina

JAR – horiokarcinomska ćelijska linija

JEG-3 – horiokarcinomska ćelijska linija

LIF – inhibitorni faktor leukemije (eng. *Leukemia Inhibitory Factor*)

miRNK – mikroRNK

MMP – matriksna metaloproteinaza

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazol bromid

PAGE – elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (eng. *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

PBS – fosfatnom-puferovani fiziološki rastvor (eng. *Phosphate-Buffered Saline*)

PCR – lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*)

PCTA-1 – antigen karcinoma tumora prostate-1 (eng. *Prostate Carcinoma Tumor Antigen-1*)

PECAM-1 – molekul adhezije trombocita i endotelnih ćelija-1 (eng. *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*)

qPCR – kvantitativna polimerazna lančana reakcija (eng. *Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

RPMI 1640 – medijum za gajenje HTR-8/SVneo ćelija (RPMI – Memorijalni institut Rozvel park, eng. *Roswell Park Memorial Institute*)

SDS – natrijum dodecil sulfat (eng. *Sodium Dodecyl Sulfate*)

SEM – Standardna greška srednje vrednosti (eng. *Standard Error of the Mean*)

siRNK – male interferirajuće RNK (eng. *Small Interfering RNA*)

siRNK – mala interferirajuća ribonukleinska kiselina

TE – trofektoderm

TGF-β – transformišući faktor rasta-beta (eng. *Transforming Growth Factor-beta*)

TNF-α – faktor nekroze tumora-alfa (eng. *Tumor Necrosis Factor-alpha*)

PE – Preeklampsija

TIMP - tkivni inhibitor matriksnih metaloproteinaza

VCAM-1 – adhezioni molekul vaskularnih ćelija-11 (eng. *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*)

VE-kadherin – vaskularni endotelni kadherin (eng. *Vascular Endothelial Cadherin*)

SADRŽAJ

UVOD	1
1.1 Placenta – anatomija i fiziološka uloga.....	2
1.2 Decidualna transformacija endometrijuma i preimplantaciona faza embriona	3
1.3 Implantacija embriona i rani razvoj placente	5
1.4 Diferencijacija trofoblasta.....	7
1.5 Molekularni medijatori trofoblastne invazije.....	9
1.5.1 Matriksne metaloproteinaze	10
1.5.2 Integrini	11
1.6 Galektini.....	11
1.6.1 Klasifikacija galektina i strukturne karakteristike.....	11
1.6.2 Biološke funkcije galektina	12
1.7 Galektin-8 – struktura i karakteristike	13
1.7.1 Funkcije galektina-8.....	13
1.7.2 Ligandi galektina-8.....	14
1.7.3 Galektin-8 u placenti i trofoblastnim ćelijama	15
1.8 Galektini u patologijama trudnoće	15
1.8.1 Preeklampsija	15
1.8.1.1 Galektini u preeklampsiji.....	16
1.8.2 Gestacijske trofoblastne bolesti.....	16
1.8.2.1 Galektini u GTB	17
CILJ ISTRAŽIVANJA	18
MATERIJAL I METODE	20
3.1 Trofoblastne ćelijske linije u kulturi	21
3.1.1 HTR-8/SVneo ćelijska linija	21
3.1.2 Horiokarcinomske ćelijske linije JAR i JEG-3	21
3.2 Tkivo placente.....	21
3.3 Tretman ćelijske linije HTR-8/SVneo rekombinantnim humanim galektinom-8	21
3.4 Utišavanje <i>LGALS8</i> gena u HTR-8/SVneo ćelijama malim interferirajućim RNK.....	22
3.5 Antitela.....	22
3.6 Određivanje broja vijabilnih i adherentnih ćelija.....	23
3.7 Funkcionalni ćelijski testovi <i>in vitro</i>	24
3.7.1 Test ćelijske adhezije.....	24
3.7.2 Test ćelijske migracije.....	25

3.7.3 Test ćelijske invazije	25
3.8 Lančana reakcija polimeraze (PCR)	25
3.9 Kvantitativna PCR analiza	26
3.10 Izolacija ćelijskih frakcija	27
3.11 Western blot analiza.....	28
3.12 SDS-PAGE želatinska zimografija	29
3.13 ELISA	30
3.14 Analiza faza ćelijskog ciklusa.....	30
3.15 Ćelijski ELISA (cELISA) test.....	31
3.16 Komet test	31
3.17 Imunocitohemija	32
3.18 Imunohistohemija.....	32
3.19 Statistička analiza.....	33
REZULTATI.....	34
4.1 Uticaj rh galektina-8 na ćelije trofoblasta	35
4.1.1 Uticaj rh galektina-8 na ćelijsku vijabilnost i raspodelu ćelija po fazama ćelijskog ciklusa	35
4.1.2 Procena genotoksičnog efekta rh galektina-8 na HTR-8/SVneo ćelije.....	36
4.1.3 Efekat rh galektina-8 na adheziju HTR-8/SVneo ćelija.....	36
4.1.4 Uticaj rh galektina-8 na migraciju i invaziju HTR-8/SVneo ćelije.....	38
4.1.5 Analiza efekta rh galektina-8 na ekspresiju integrinskih subjedinica $\alpha 1$ i $\beta 1$ u HTR-8/SVneo ćelijama	40
4.1.6 Uticaj rh galektina-8 na gensku ekspresiju i nivo MMP-2 i MMP-9.....	41
4.2 Ispitivanje efekata utišavanja ekspresije <i>LGALS8</i> gena na HTR-8/SVneo ćelijsku liniju.....	43
4.2.1 Efikasnost utišavanja ekspresije <i>LGALS8</i> gena na HTR-8/SVneo ćelijisku liniju	43
4.2.2 Procena vijabilnosti HTR-8/SVneo ćelija nakon utišavanja ekspresije <i>LGALS8</i> korišćenjem MTT testa	44
4.2.3 Efekat utišavanja ekspresije <i>LGALS8</i> na sposobnost adhezije HTR-8/SVneo ćelijsku liniju	44
4.2.4 Analiza migracionog i invazivnog potencijala na HTR-8/SVneo ćelijsku liniju nakon utišavanja ekspresije <i>LGALS8</i>	45
4.2.5 Efekat utišavanja <i>LGALS8</i> na proteolitičku aktivnost matriksnih metaloproteinaza i na ekspresiju tkivnih inhibitora metaloproteinaza u HTR-8/SVneo ćelijsku liniju	46
4.2.6 Efekat utišavanja <i>LGALS8</i> na ekspresiju integrina $\alpha 1$ i $\beta 1$ u HTR-8/SVneo ćelijsku liniju.....	48
4.3 Određivanje ekspresije galektina-8 u normalnim i maligno transformisanim (horiokarcinomskim) trofoblastnim ćelijama.....	48

4.3.1 Ekspresija <i>LGALS8</i> gena u normalnim ekstravilusnim trofoblastnim ćelijama i ćelijama horiokarcinoma.....	49
4.3.2 Ekspresija galektina-8 na proteinskom nivou u HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3 ćelijskim linijama.....	50
4.3.3 Imunolokalizacija galektina-8 u HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3 ćelijskim linijama.....	51
4.3.4 Subcelularna ekspresija galektina-8 u HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3 ćelijskim linijama.....	51
4.4 Ekspresija galektina-8 u tkivu placenti nakon normalne trudnoće i trudnoće komplikovanih preeklampsijom.....	52
4.4.1 Ekspresija <i>LGALS8</i> gena u tkivu placenti nakon normalne trudnoće i trudnoće komplikovanih preeklampsijom.....	52
4.4.2 Nivo galektina-8 u tkivu placenti nakon normalne trudnoće i trudnoće sa preeklampsijom	53
4.4.3 Imunolokalizacija galektina-8 u tkivu placenti nakon normalne trudnoće i trudnoće sa preeklampsijom.....	54
DISKUSIJA	56
ZAKLJUČCI.....	63
LITERATURA.....	65

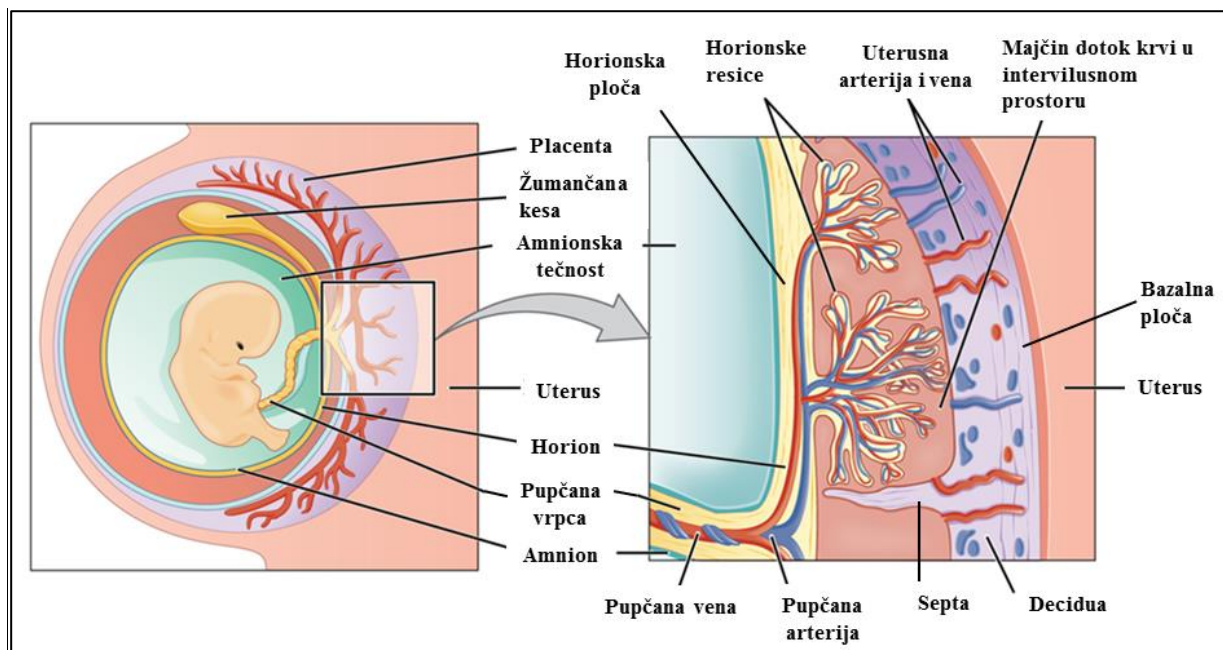
UVOD

1.1 Placenta – anatomija i fiziološka uloga

Tokom trudnoće se razvija privremeni, ali izuzetno važan organ – placenta, koja preuzima niz ključnih funkcija koje omogućavaju preživljavanje, pravilan razvoj i očuvanje zdravlja fetusa. Kao hemohorijalni organ kod ljudi, placenta omogućava direktan kontakt ćelija placente sa majčinom krvlju [1], čime se obezbeđuje efikasna razmena gasova, hranljivih materija, hormona i metaboličkih produkata [2]. Pored nutritivne i respiratorne funkcije, placenta ima ključnu ulogu u imunološkoj zaštiti fetusa i regulaciji trudnoće. Posebno je važna njena barijerna uloga – placenta sprečava direktno mešanje krvi majke i fetusa, čime se smanjuje rizik od imunološkog odbacivanja ploda. Placenta funkcioniše i kao ključni endokrini regulator trudnoće – koordiniše hormonski regulisane procese koji podržavaju razvoj fetusa i pripremaju organizam majke za porođaj i laktaciju [3]. Sve ove složene i koordinisane funkcije placente ukazuju na krucijalni značaj ovog organa tokom intrauterinog razvića.

U terminskoj trudnoći, placenta ima tipično diskoidni oblik, prečnika između 15 i 20 cm, prosečne debljine oko 3 cm u centralnom delu i mase približno 450 g [4]. Makroskopski, placenta se sastoji od dve jasno diferencirane ploče: horionske ploče, za koju se vezuje pupčana vrpca i okrenuta je ka fetusu, i bazalne ploče, koja se nalazi u neposrednom kontaktu sa majčinim endometrijumom [4]. Prostor između ovih ploča čini intervilusni prostor, ispunjen majčinom krvlju koja dospeva iz spiralnih arterija uterusa kroz otvore u bazalnoj ploči [4]. Bazalna ploča se sastoji od *decidue basalis* (deo endometrijuma koji učestvuje u formiranju placente) i sadrži majčinske krvne sudove koji se ulivaju u intervilusni prostor. Ova šupljina je na ivicama diska ograničena fuzijom horionske i bazalne ploče [4]. Glatki horion, (lat. *chorion laeve*), proteže se od ivice placente i zatvara horionsku kesu [4]. Placenta je delimično podeljena na 10 do 40 reznjeva septama koje nastaju invaginacijama bazalne ploče [4] (**Slika 1**). Smatra se da septe doprinose kompartmentalizaciji, a samim tim i usmeravanju protoka majčine krvi [4].

Fetalni deo placente čini niz složeno razgranatih vilusnih stabala koja polaze sa unutrašnje površine horionske ploče i pružaju se u šupljinu placente [4]. Najčešće, svako vilusno stablo nastaje iz jednog izdanka koji se grananjem razvija sve do formiranja funkcionalne jedinice placente – terminalne *horionske resice* [4]. Razlikujemo sidreće resice, kojima je placenta pričvršćena za zid uterusa, i slobodne resice, koje u najvećoj meri učestvuju u razmeni materija između fetusa i majke. Intervilusni prostor sadrži složenu mrežu kanala kroz koje se majčina krv filtrira i cirkuliše, omogućavajući efikasnu razmenu gasova i hranljivih materija sa fetalnom krvlju koja protiče unutar resice, pre nego što se drenira kroz bazalnu ploču u otvore uterusnih vena [4] (**Slika 1**).

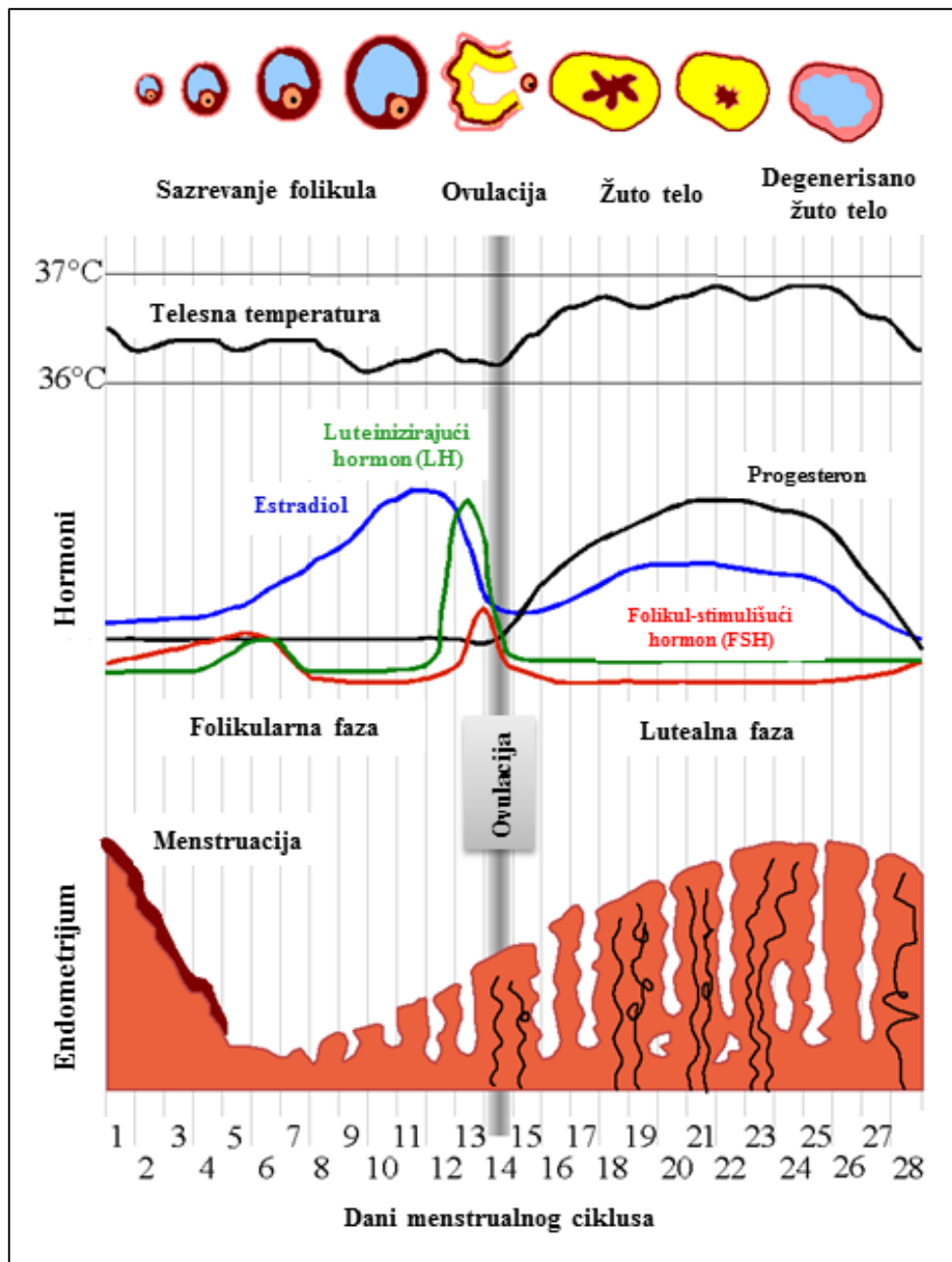


Slika 1. Struktura placente. (Modifikovano iz: Betts J.G. *et al.* Anatomy & Physiology, 28.2 Embryonic development; OpenStax; CC BY 4.0 [5])

1.2 Decidualna transformacija endometrijuma i preimplantaciona faza embriona

Reproduktivni sistem žene funkcioniše kroz ciklične promene koje se odvijaju u okviru menstrualnog ciklusa (**Slika 2**). Ovaj proces obuhvata koordinisano delovanje hormona hipotalamusa i jajnika [6], čime se regulišu proliferativna i sekretorna faza endometrijuma. Menstrualni ciklus čine dve glavne faze:

1. Folikularna (proliferativna) faza – obuhvata sazrevanje folikula i regeneraciju endometrijuma, pod uticajem estradiola, steroidnog hormona iz grupe estrogena [7].
2. Lutealna (sekretorna) faza – nastaje nakon ovulacije, kada progesteron priprema endometrijum za potencijalnu implantaciju [7]. Ovaj hormon je esencijalan za održavanje i diferencijaciju endometrijuma [8].



Slika 2. Varijacije tokom menstrualnog ciklusa glavnih uključenih hormona, bazalne telesne temperature i relativne debljine endometrijuma. (Modifikovano iz: File:MenstrualCycle2.png - Wikimedia Commons; Autor: Lyrl; CC BY-SA 3.0 [9]).

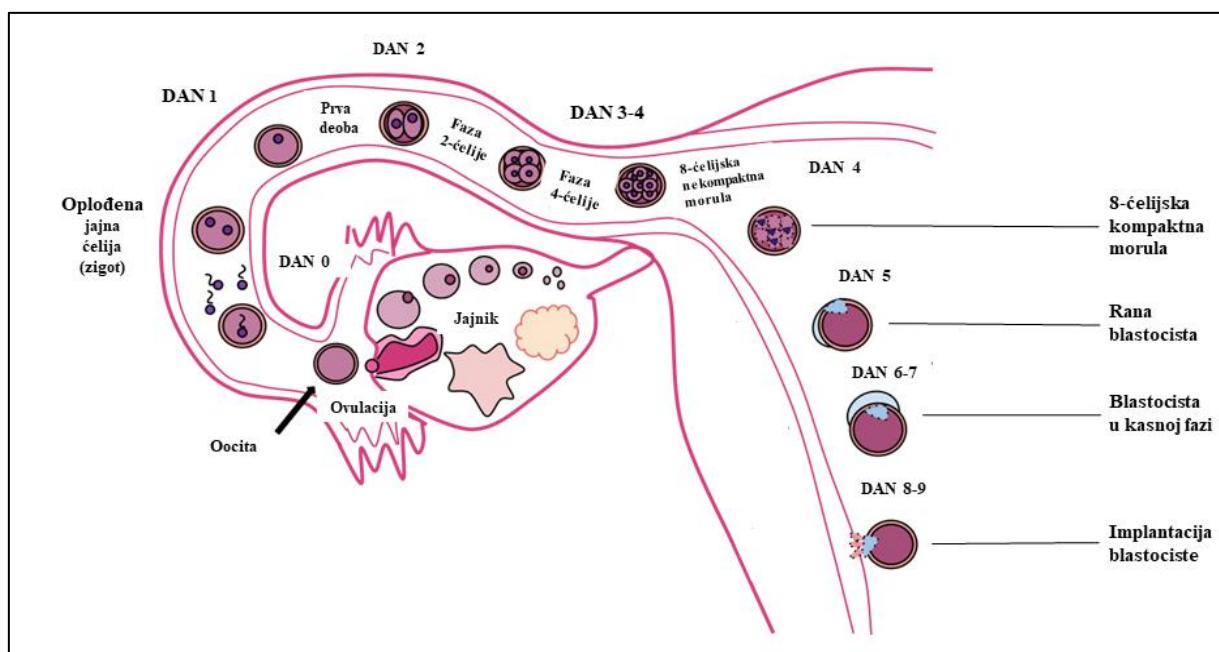
Između folikularne i lutealne faze ciklusa je takozvana ovulatorna faza, period u kom dolazi do završnog sazrevanja jajne ćelije i njenog oslobađanja u jajovod [10], što je osnovni preduslov za oplodjenje. Tokom procesa razvoja, oociti su obavijeni specijalizovanim matriksom građenim od glikoproteina, poznatim kao *zona pellucida* [11]. Ova složena i dinamična struktura ima ključnu ulogu u oogenezi, procesu oplodjenja, kao i u inicijalnim fazama embrionskog razvoja [11]. Tokom svakog ciklusa endometrijum se priprema za potencijalnu implantaciju, stvarajući optimalne uslove za prihvatanje oplodjene jajne ćelije. Ukoliko ne dođe do oplodjenja, funkcionalni sloj endometrijuma se ljušti, što se manifestuje kao menstruacija [6].

U slučaju da dođe do oplodjenja, nastaje zigot koji prolazi kroz brze mitotske deobe ćelija, poznate kao brazdanje (blastomerizacija) pri čemu se broj blastomera progresivno povećava [12]. Približno na stadijumu sa osam ćelija počinju da se javljaju prve funkcionalne razlike među

ćelijama, što označava početak celularne heterogenosti [12]. Tokom narednih dana, embrion prelazi u morulu, a zatim, približno između četvrtog i petog dana razvoja, paralelno sa dospevanjem u lumen uterusa, dolazi do formiranja blastociste i započinje proces implantacije [12] (**Slika 3**). Decidualizacija je proces tokom kojeg endometrijum prolazi kroz morfološke i funkcionalne adaptacije, čiji rezultat je stvaranje decidualnog sloja neophodnog za implantaciju blastociste [13]. Decidualizacija otpočinje u toku progesteronske faze, dejstvom hormona, a nastavlja se nakon implantacije, dejstvom faktora embrionalnog porekla u procesu poznatom kao *decidualna reakcija* [14]. Sposobnost endometrijuma da primi embrion javlja se u ograničenom vremenskom okviru poznatom kao „prozor implantacije“, koji počinje 4-5 dana nakon stimulacije progesteronom i traje približno oko 9-10 dana [15].

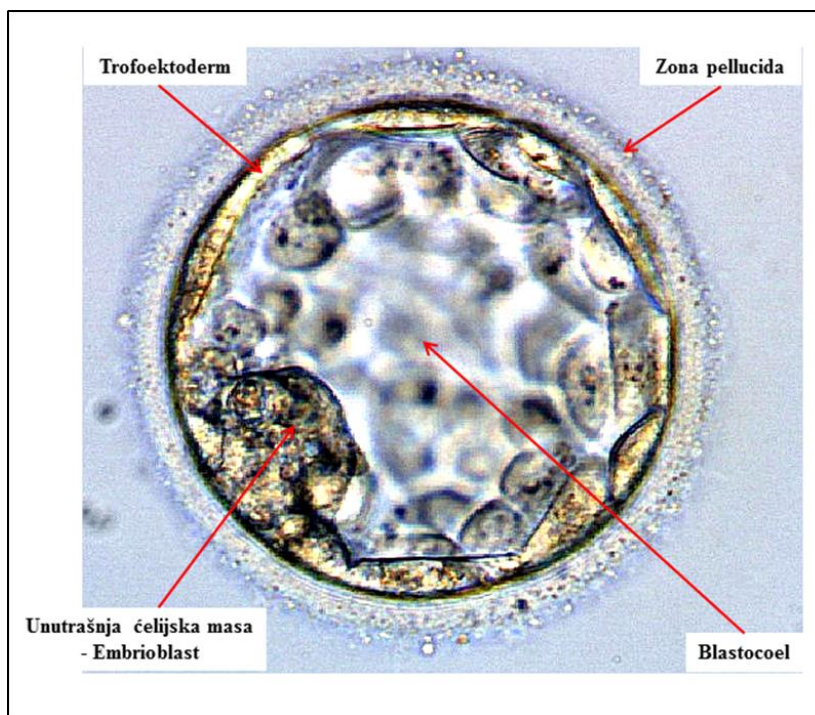
1.3 Implantacija embriona i rani razvoj placente

Implantacija se odvija u tri uzastopne faze: apozicija (približavanje blastociste endometrijumu), adhezija (uspostavljanje čvrstog kontakta) i penetracija (invazija trofoblasta u endometrijalno tkivo) [15]. Ključnu ulogu u ovom trenutku preuzima spoljašnji sloj ćelija blastociste, koji inicira invaziju u endometrijum i omogućava uspostavljanje čvrste veze između embriona i majčinog organizma.



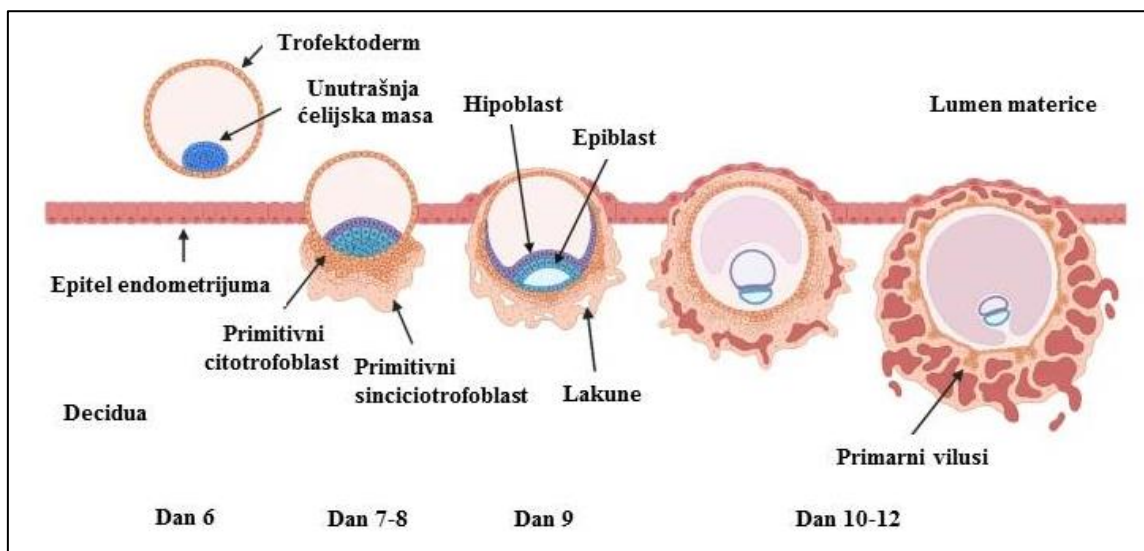
Slika 3. Oplođenje kod čoveka. Fuzijom spermatozoida i jajne ćelije nastaje zigot, koji tokom narednih 8–9 dana prolazi kroz seriju deoba i implantira se u zid uterusa, gde nastavlja razvoj tokom devet meseci. (Modifikovano iz: File: Human Fertilization.png - Wikimedia Commons; Autor: Ttrue1; CC BY-SA 3.0 [16]).

Blastocista se sastoji od unutrašnje ćelijske mase, iz koje će se formirati fetus, i spoljašnjeg sloja ćelija nazvanog trofektoderm (TE) (**Slika 4**). Trofektoderm predstavlja morfološki diferencirani sloj ćelija koji se formira petog dana nakon oplođenja kao polarizovani epitelni sloj ćelija [17,18]. Blastocel predstavlja unutrašnju šupljinu blastociste ispunjenu tečnošću [5].



Slika 4. Preimplantacioni embrion – blastocista. (Modifikovano iz: File:Бластоциста человека 5-е сутки развития.jpg - Wikimedia Commons; Autor: NinaSes; CC BY-SA 4.0 [19]).

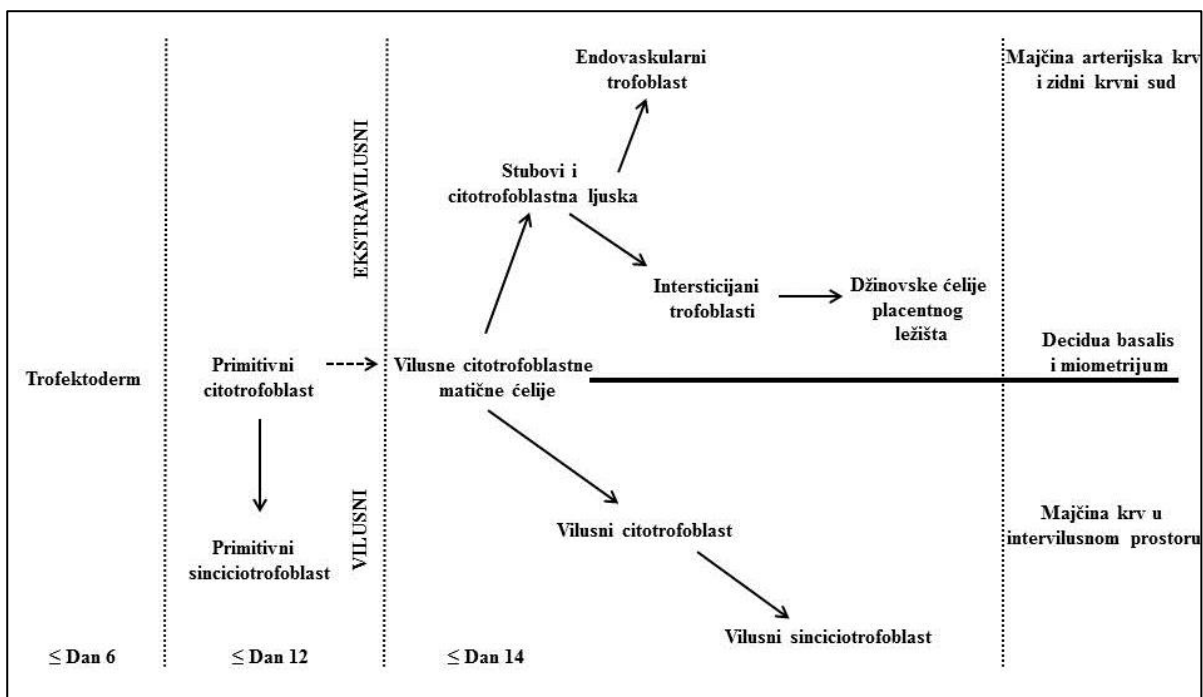
Blastocista dolazi u kontakt sa decidualno transformisanim endometrijumom, što omogućava uspešnu implantaciju i početak formiranja placente, koja se razvija iz TE [18]. Deo TE koji se nalazi neposredno iznad unutrašnje ćelijske mase, je polarizovan i ostvaruje kontakt sa površinskim epitelom endometrijuma uterusa [18], čime se inicira proces implantacije. Tokom rane faze implantacije, ćelije trofoektoderma se diferenciraju u dva funkcionalno i morfološki različita sloja: unutrašnji sloj **citotrofoblasta** i spoljašnji sloj sinciotrofoblasta [20]. Citotrofoblastne ćelije (CTB) predstavljaju proliferativnu populaciju koja kontinuirano daje nove ćelije i koje fuzionišu u sinciotrofoblast – terminalno diferenciranu višejedarnu strukturu bez ćelijskih granica, u direktnom kontaktu sa majčinim tkivom. Sinciotrofoblast progresivno prodire u endometrijum, omogućavajući postepeno ugrađivanje blastociste u decidualno tkivo [20] (**Slika 5**). Tokom ranog razvoja placente u okviru *decidue basalis* formiraju se placentalne lakune – prošireni prostori ispunjeni majčinom krvlju. U blastocisti se unutrašnja ćelijska masa diferencira u dva sloja ćelija – epiblast i hipoblast – koji zajedno formiraju bilaminarni embrionski disk [21].



Slika 5. Implantacija blastociste i rana placentacija – razvoj prvih trofoblastnih linija. (Modifikovano iz: James *et al.*, 2022 [22]).

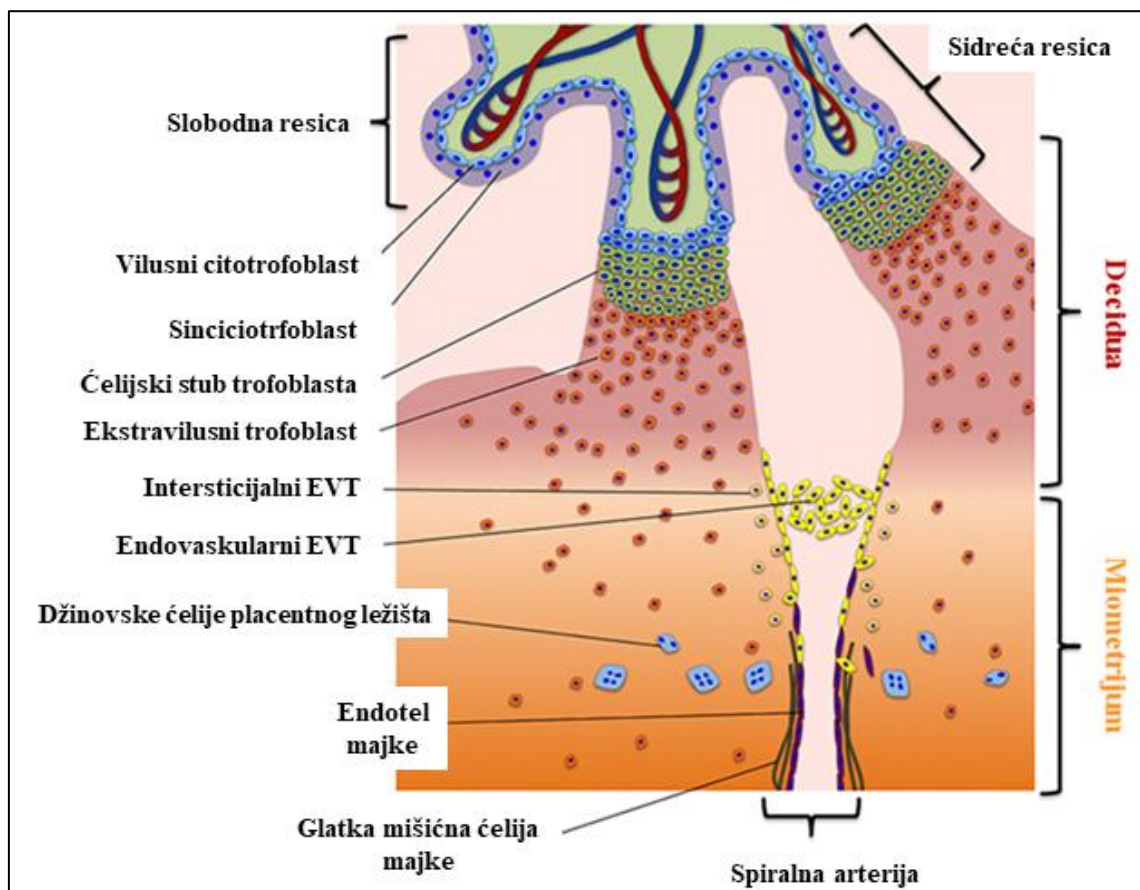
1.4 Diferencijacija trofoblasta

Približno dve nedelje nakon implantacije blastociste, unutrašnji citotrofoblastni sloj TE započinje proliferaciju, formirajući pupoljke koji se probijaju kroz spoljašnji sincicijumski sloj [23]. Ovaj proces označava početak formiranja primarnih horionskih vilusa. Tokom daljeg razvoja, citotrofoblast se diferencira u vilusni i ekstravilusni trofoblast (EVT) [23] (**Slika 6**) koji imaju različite i specifične uloge u uspostavljanju efikasne razmene materija između majke i fetusa. Vilusni trofoblast čini sloj citotrofoblastnih ćelija koje naležu na bazalnu membranu vilusnog jezgra, i sinciotrofoblast, koji nastaje kontinuiranom proliferacijom i fuzijom citotrofoblasta. Sinciotrofoblast oblaže horionske resice, stvarajući selektivnu barijeru kroz koju se odvija metabolička razmena, dok istovremeno ostvaruje direktan kontakt sa majčinom krvlju u intervalusnom prostoru [23].



Slika 6. Diferencijacija trofoblasta na mestu implantacije. (Modifikovano iz: Loke i King, 1995 [24]).

Na vrhovima sidrećih resica, kojim je placenta pričvršćena za zid uterusa, proliferacijom citotrofoblasta dolazi do formiranja citotrofoblastnih ćelijskih stubova od kojih nastaje EVT. Ekstravilusni trofoblast se diferencira u dva glavna podtipa: intersticijalni (iEVT) i endovaskularni (eEVT) trofoblast. Intersticijalni EVT vrši invaziju decidue i miometrijuma, učvršćujući placentu i omogućavajući njenu strukturnu integraciju sa tkivom uterusa. Sa druge strane, eEVT migrira u spiralne arterije uterusa i aktivno ih remodeluje, čime se obezbeđuje adekvatan dotok krvi ka placenti (**Slika 7**). Zajedno, ove ćelije igraju ključnu ulogu u vaskularnom remodelovanju i uspostavljanju efikasne materno-fetalne cirkulacije [23], pri čemu dolazi do transformacije spiralnih arterija u strukture sa visokim protokom i niskim otporom, čime se obezbeđuje dovoljan protok krvi kroz placentu i podržava rast i razvoj fetusa [25].



Slika 7. Zona interakcije majke i fetusa. Slika prikazuje tipove ćelija placente čoveka u ranom prvom trimestru, kao i put invazije EVT u deciduu i miometrijum. (Modifikovano iz: Carvajal *et al.*, 2021 [26]).

Diferencijacija proliferativnih CTB u invazivne EVT odvija se kroz molekularne mehanizme koji nisu dovoljno razjašnjeni [27]. Jedan od glavnih razloga za ograničeno razumevanje ovog procesa jeste činjenica da se EVT diferencijacija *in vitro* može proučavati isključivo korišćenjem uzoraka placente iz prvog trimestra, čija je dostupnost ograničena zbog etičkih i praktičnih razloga [27]. Smatra se da je ograničena dubina invazije spiralnih arterija često u korelaciji sa razvojem preeklampsije i intrauterinim zastojem rasta fetusa, dok neuspešna endovaskularna invazija trofoblata može doprineti nastanku spontanog pobačaja [28].

1.5 Molekularni medijatori trofoblastne invazije

Epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT) trofoblata označava proces u kojem ćelije citotrofoblata, gube tipične epitelne karakteristike (polarizaciju i međućelijske adhezivne veze) i stiču fenotip mezenhimskih ćelija sa sposobnošću migracije i invazije [29]. Tokom normalnog razvoja, EMT je strogo regulisan i koordinisan proces, čiji poremećaji se povezuju sa patološkim stanjima poput metastaza i progresijom karcinoma [29]. EMT može biti indukovana širokim spektrom faktora, uključujući hormone, citokine, hemokine, mikroRNK, kao i interakcijom sa ECM (ekstracelularni matriks, eng. *extracellular matrix*), čime se pokreću različiti signalni putevi [29]. Deo ovih ćelija diferencira se u džinovske ćelije placentnog ležišta i miometrijuma, pri čemu EVT stiče specifičan fenotip [30]. Proces diferencijacije i invazije trofoblata u velikoj meri zavisi od regulacije međućelijske adhezije [31]. Ovi procesi obuhvataju: odvajanje prekursorskih EVT od bazalne membrane, odvajanje migratornih EVT ćelija od distalnih ćelijskih stubova, uspostavljanje nove adhezije sa ECM endometrija, kao i migraciju u vaskularne i invaziju u intersticijalne

odeljke majčinog tkiva [31] (**Slika 7**). Realizacija ovih događaja uslovljena je sticanjem pokretljivosti i promenom u ekspresiji adhezionih molekula. [31]. Tokom diferencijacije CTB u ćelijskim stubovima dolazi do pojačane ekspresije sledećih adhezionih molekula: VCAM-1 (adhezioni molekul vaskularnih ćelija-1), PECAM-1 (molekul adhezije trombocita i endotelnih ćelija-1), L-selektin, VE-kadherin (vaskularni endotelni kadherin, eng. *vascular endothelial cadherin*), CAD-11 (kadherin-11, eng. *Cadherin-11*), CD9 (klaster diferencijacije 9, eng. *Cluster of Differentiation 9*), efrin-B1 i -B2, kao i integrina $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$ i $\alpha 6\beta 1$ [31]. Početak diferencijacije i/ili invazije citotrofoblasta obeležen je smanjenom ekspresijom receptora tipičnih za polarizovane epitelne progenitore, kao što su integrin $\alpha 6\beta 4$ i epitelni kadherin (E-kadherin) [28].

Invazija trofoblasta tokom implantacije i placentacije je precizno regulisan biološki proces [32]. *In vitro* studije ukazuju na to da su različiti autokrini (trofoblastnog porekla) i parakrini (poreklom iz decidue) faktori koji uključuju: citokine, faktore rasta, hormone i komponente ECM, odgovorni za regulaciju ovog procesa [32]. Poseban značaj ima interakcija integrina — membranskih receptora uključenih u ćelijsku adheziju — sa elementima ECM, koja ne samo da olakšava invaziju trofoblastnih ćelija, već utiče i na ekspresiju i aktivnost MMP (matriksnih metaloproteinaza), pod direktnim ili indirektnim uticajem pomenutih regulatora [32].

Interleukini (IL)-1, -6, -10, -15, faktor nekroze tumora alfa (eng. *Tumor Necrosis Factor-alpha* – TNF- α), epidermalni faktor rasta (eng. *Epidermal Growth Factor* – EGF), inhibitorni faktor leukemije (eng. *Leukemia Inhibitory Factor* – LIF), transformišući faktor rasta - β (*Transforming Growth Factor* – TGF- β), insulinu-sličan faktor rasta vezujući protein 1 (eng. *Insulin-like Growth Factor-Binding Protein* – IGFBP-1) i insulinu-sličan faktor rasta 2 (eng. *Insulin-like Growth Factor 2* – IGF-2) identifikovani su kao ključni regulatorni molekuli koji poseduju sposobnost modulacije sekrecije MMP, kao i regulacije invazivnog potencijala trofoblastnih ćelija [32]. Među molekularnim medijatorima EVT, koji su bili predmet ispitivanja, izdvajaju se MMP i integrini.

1.5.1 Matriksne metaloproteinaze

Matriksne metaloproteinaze su cink-zavisne endopeptidaze esencijalne za invazivne i metastatske procese ćelija, sekretuju se iz ćelije u ECM i omogućavaju direktnu proteolitičku razgradnju komponenata ECM [33]. Smatra se da kod kičmenjaka, MMP enzimi, uključujući želatinaze, omogućavaju kontrolisano remodelovanje ECM tokom procesa razvoja i ćelijske diferencijacije [34]. Takođe, ovi enzimi su povezani sa patološkim stanjima, uključujući tumorsku invaziju i metastatske procese [35]. Prema navodima iz preglednog rada Visse i saradnika, funkcionalna aktivnost MMP u fiziološkim uslovima podložna je višestrukoj regulaciji: počev od transkripcione ekspresije i proteolitičke aktivacije zimogena, preko interakcija sa komponentama ECM, pa sve do inhibicije posredstvom endogenih molekula [36]. Tkivne MMP mogu da se klasifikuju prema supstratnoj specifičnosti u četiri glavne grupe: kolagenaze, želatinaze (MMP-2 i -9), stromelizini i heterogena grupa koja uključuje enzime sa specifičnim funkcijama [37]. Membranski vezane MMP se, u okviru ove klasifikacije, izdvajaju kao jedinstvena grupa [37]. Želatinaza A (MMP-2, kolagenaza tipa IV od 72 kDa) i želatinaza B (kolagenaza tipa IV od 92 kDa) su nazvane prema sposobnosti da enzimski razgrađuju želatin, odnosno denaturisani kolagen [37]. Brojni aspekti invazije trofoblasta pokazuju sličnosti sa invazijom tumorskih ćelija [38]. Paralele između ova dva procesa sugerišu da oni funkcionišu kroz zajedničke mehanizme [38]. Dok je invazija tumora nekontrolisana i progresivna, invazija trofoblasta je precizno regulisana, prostorno ograničena na uterus i vremenski na ranu trudnoću [38]. Efikasna invazija citotrofoblasta zahteva razgradnju kolagena tipa IV, glavne komponente bazalne lamine [38]. Brojna istraživanja ukazuju na to da su sinteza i aktivacija MMP-2 i MMP-9 od suštinskog značaja za uspešnu invaziju trofoblastnih ćelija [38–41]. Tokom prvog trimestra trudnoće, trofoblastne ćelije pokazuju promenljiv profil sekrecije želatinaza, koji se dinamično menja u zavisnosti od nedelje gestacije

[42]. U ranoj fazi trudnoće (6–8 nedelja), MMP-2 predstavlja dominantnu želatinazu i ključni enzim u invaziji trofoblata. Tokom kasnijeg perioda prvog trimestra (9–12 nedelja), u invazivnim procesima trofoblata učestvuju oba enzima (MMP-2 i MMP-9), međutim, moguće je da i drugi MMP proteini učestvuju u ovom procesu [42].

Kako je opisano u preglednom radu Vissea i Nagasea, tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMP) deluju kao specifični inhibitori, kontrolišući aktivnost MMP u različitim tkivima [36]. Ovi inhibitori se vezuju za MMP, čime blokiraju njihovu katalitičku aktivnost i doprinose očuvanju homeostaze ECM [36]. Kako navode Brew i saradnici u svom preglednom radu, kod ljudi postoje četiri TIMP, pri čemu TIMP-1 specifično deluje na MMP-9, a TIMP-2 na MMP-2 [43].

1.5.2 Integrini

Integrini predstavljaju glavne receptore za ćelijsku adheziju, koji omogućavaju povezivanje ćelija sa komponentama ECM [44]. U nekim slučajevima, integrini učestvuju i u specifičnim međućelijskim interakcijama [44]. Unutar ćelije, integrini su povezani sa citoskeletom i aktiviraju brojne signalne puteve, čime utiču na različite ćelijske funkcije [44]. Integrini su predmet brojnih istraživanja i predstavljaju najbolje proučene receptore ćelijske adhezije [44]. Njihova interakcija sa odgovarajućim ligandima ima ključnu ulogu u razvoju, imunološkim odgovorima, migraciji leukocita, hemostazi i progresiji tumora, a disfunkcija integrinskih puteva povezana je sa brojnim bolestima, uključujući genetička, autoimunska i maligna oboljenja [44]. Strukturno, svaki molekul integrina se sastoji od dve transmembranske glikoproteinske subjedinice, označene kao α i β , koje su međusobno povezane nekovalentnim interakcijama [45]. Kao transmembranski linkeri, integrini posreduju u vezivanju ćelija za matriks posredujući u interakciji citoskeleta i ECM. [45]. Većina integrina je sa citoplazmatske strane ćelijske membrane indirektno povezana sa snopovima aktinskih filamenata [45].

Ekspresija integrina $\alpha 1\beta 1$ kod CTB se značajno povećava tokom rane gestacije, što je direktno povezano sa sticanjem invazivnog fenotipa. Kod CTB izolovanih iz terminske placente ne dolazi do povećanja ekspresije integrina $\alpha 1$, za razliku od CTB prvog i drugog trimestra, što dodatno potvrđuje da je ovaj integrin ključan za regulaciju invazije u ranoj trudnoći [46]. Ova promena u ekspresiji integrina poznata je kao "*switching*" mehanizam, koji omogućava CTB ćelijama da se prilagode mikrokruženju endometrijuma [46].

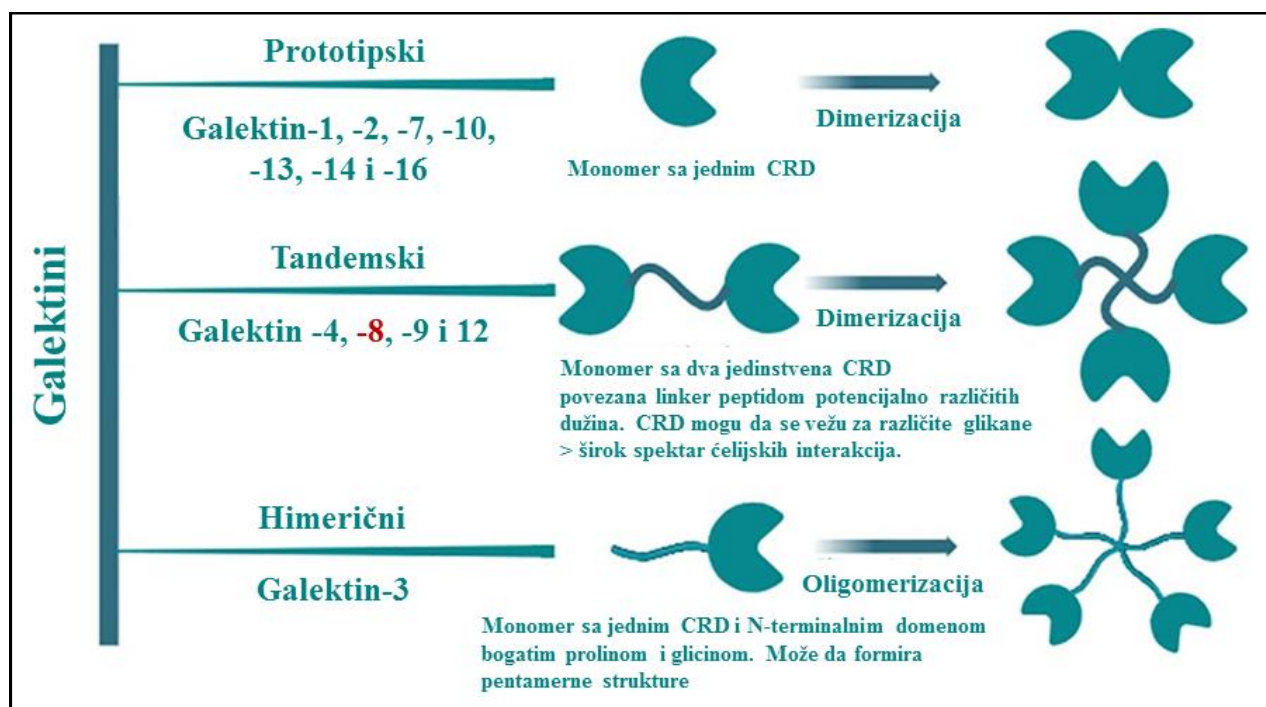
1.6 Galektini

Među različitim regulatornim molekulima značajnim za biološka svojstva trofoblata, galektini su privukli značajnu pažnju zbog svoje uloge u modulaciji ćelijskih funkcija. Galektini su evoluciono konzervisana grupa lektina, proteina sa sposobnošću vezivanja ugljeno-hidratnih struktura, sa afinitetom prema β -galaktozidima [47]. Galektini su najdominantnije eksprimirana klasa lektina kod svih životinja [47], od beskičmenjaka do čoveka, a njihova ekspresija se razlikuje u zavisnosti od tipa ćelija i tkiva [48].

1.6.1 Klasifikacija galektina i strukturne karakteristike

Galektini, kodirani *LGALS* genima, prisutni su u jedru, citosolu, plazma membrani i vanćelijskom prostoru, gde učestvuju u različitim biološkim procesima [47,49]. Kako je navedeno u više preglednih radova, njihova prisutnost je potvrđena u ekstracelularnom prostoru, kao i u endozomalnim i vezikularnim odeljcima [50–52]. Transkripti za galektine mogu biti alternativno splajsovani, što omogućava nastanak više različitih izoformi, kao što su na primer galektin-8 i -9 [53,54]. Njihova sposobnost da se vezuju za β -galaktozide potiče iz specifičnih aminokiselinskih sekvenci prisutnih u domenu za prepoznavanje ugljenih hidrata (eng. *Carbohydrate Recognition*

Domain – CRD) [55]. Kod čoveka je identifikovano 12 članova ove porodice [56], koji se svrstavaju u tri strukturne kategorije: prototipski, himerični i tandemski [57] (**Slika 8**).



Slika 8. Klasifikacija galektina. (Modifikovano iz: Shil *et al.*, 2024 [58])

Prototipski galektini (galektin-1, 2, 7, 10, 13, 14 i 16) sadrže jedan CRD i najčešće formiraju homodimere. Galektin-3 je jedini član himerične grupe galektina; sadrži jedan CRD, a zahvaljujući prisustvu neelektinskog N-terminalnog domena može formirati oligomere. Tandemski galektini (galektin-4, -8, -9 i -12) u okviru jednog polipeptidnog lanca poseduju dva CRD koji najčešće pokazuju različit afinitet prema specifičnim glikanima. Ova dva domena međusobno su povezana kratkom peptidnom sekvencom (eng. *linker peptide*) [59–61]. Najjednostavniji šećeri sa kojima galektini ostvaruju vezivanje relativno niskog afiniteta su laktoza i N-acetilaktiozamin (LacNAc). Afinitet galektina se povećava sa povećanjem broja LacNAc ponovaka i njihovim grananjem u okviru N-glikana [62]. Iako svi galektini poseduju CRD, određeni članovi ove porodice mogu da se vezuju za intra- i ekstracelularne ligande i ne podrazumevaju interakcije galektina sa šećernim strukturama [48].

1.6.2 Biološke funkcije galektina

Neki galektini mogu biti široko rasprostranjeni u ćelijama i tkivima, dok se drugi nalaze u specijalizovanim tipovima ćelija, tkiva i organa: fibroblastima, neuronima, imunskim ćelijama, epitelu, masnom tkivu, plućima, placenti i gastrointestinalnom traktu [63]. Galektini ne poseduju amino-terminalnu signalnu sekvencu koja bi im omogućila sekreciju uobičajenim putem [48]. Uprkos tome, svoje funkcije ostvaruju intracelularno, ali i na površini ćelije i/ili u ECM. Ekstracelularne funkcije galektina ostvaruju se zahvaljujući njihovoj sposobnosti specifičnog prepoznavanja i vezivanja ugljenih hidrata (lektinski tip), dok su interakcije unutar ćelije neelektinskog tipa (protein-protein interakcija) [64,65].

Galektini imaju uloge u imunskoj regulaciji, ćelijskoj signalizaciji i razvoju malignih bolesti. U aktiviranim B i T limfocitima, kao i regulatornim T limfocitima, zatim dendritskim ćelijama, neutrofilima i dr. imaju ključnu ulogu u regulaciji imunskih i inflamatornih procesa [66]. U zavisnosti od mikrookruženja kao i vrste ćelija na koje deluju, galektini mogu podsticati

proinflamatorne ili antiinflamatorne efekte [59]. Takođe imaju sposobnost da modulišu ćelijsku morfogenezu (migraciju ćelija, njihovu proliferaciju, međućelijsku adheziju, kao i promene u morfologiji ćelija), intracelularni transport, signalne puteve i proces ćelijske smrti [48]. Pored toga, oni deluju kao ključni regulatori homeostaze intracelularnih membrana, pri čemu prepoznaju glikane izložene usled oštećenja, koji su u normalnim uslovima skriveni unutar endozoma/lizozoma [48]. Prepoznavanje ovih glikana posredstvom galektina omogućava prepoznavanje lizozoma kompromitovanih bakterijskom ili virusnom infekcijom, čime se pokreće njihovo uklanjanje putem autofagije [48]. Intracelularno, galektini mogu imati i nukleusne funkcije – učestvuju u procesuiranju iRNK i interaguju sa transkripcionim faktorima, čime utiču na invaziju epitelnih ćelija, kao što je pokazano za galektin-1 [48,67].

Interakcije galektina sa glikanima su složene i ovi proteini mogu formirati vanćelijske galektin-glikan rešetke sa odgovarajućim glikokonjugatima. Na taj način se može sprečiti endocitoza membranskih receptora, a mogu se i pokrenuti različite signalne kaskade [68].

1.7 Galektin-8 – struktura i karakteristike

Gen *LGALS8* kodira protein galektin-8 i smešten je na hromozomu 1q42.11 kod čoveka. Ovaj gen obuhvata približno 33 kbp genomske DNK i organizovan je u 11 egzona [69]. Galektin-8 predstavlja protein iz porodice galektina sa strukturom tandemskih ponovaka, molekulske mase 34 kDa, koji se sastoji od dva CRD povezana linker peptidom [70]. Galektin-8 je prvobitno identifikovan u jetri pacova kao β -galaktozid-vezujući protein [70]. Zbog svoje visoke ekspresije u ćelijama karcinoma prostate kod ljudi, uz istovremeno odsustvo u tkivima zdrave prostate i prostate sa benignom hiperplazijom, ovaj protein je inicijalno nazvan antigen karcinomskog tumora prostate-1 (eng. *Prostate Carcinoma Tumor Antigen-1* – PCTA-1) [71]. Alternativno iskrajanje pre-iRNK gena *LGALS8* dovodi do nastanka šest izoformi galektina-8, od kojih su tri tandemski tipovi sa dva CRD domena povezana *hinge* peptidom, a tri prototipski tipovi sa jednim CRD domenom [53]. U skladu sa tim, ove se izoforme smatraju članovima podfamijije galektina-8 [72].

Galektin-8 poseduje dva različita CRD – N-terminalni (Gal-8N) i C-terminalni (Gal-8C). Ova dva domena povezana su fleksibilnim *linker* peptidom i zajedno omogućavaju proteinu da prepozna širok spektar glikana i glikoproteina. Pored β -galaktozida za visok afinitet galektina-8 je neophodno i prisustvo drugih oligosaharidnih struktura [73]. *In vitro* istraživanja su pokazala da N-terminalni CRD galektina-8 ima visok afinitet prema sijalilovanim ili sulfatizovanim galaktozidima, što je dovoljno da objasni njegovo vezivanje za ćelijsku površinu bez potrebe za multivalentnim interakcijama [73]. Ipak, ovaj domen se vezuje i za različite nesijalilovane ili nesulfatizovane saharide, pri čemu afiniteti variraju u nižem rasponu. Zahvaljujući ovim afinitetima, N-CRD i C-CRD deluju zajedno, vezuju se za površinu ćelije i pokreću signalne procese [73]. Galektin-8 na taj način pokazuje relativno široku sposobnost prepoznavanja glikonjugata na ćelijskoj površini i aktivaciji signalnih puteva, što može imati značajnu funkciju [73].

1.7.1 Funkcije galektina-8

Dodatne studije su identifikovale galektin-8 u različitim tipovima ćelija, pokazujući kontekst-zavisne funkcionalne ishode koji naglašavaju njegove raznovrsne biološke i patološke uloge [53,72,74–79]. Njegova interakcija sa određenim integrinima pokazala je sposobnost modulacije ECM-zavisne integrinske signalizacije, čime utiče na ćelijsku adheziju i preživljavanje [80]. Dodatno, utvrđeno je da galektin-8 moduliše interakcije ćelija i ECM u *in vitro* uslovima [81]. Sekretovani galektin-8 može delovati kao fiziološki regulator ćelijske adhezije putem interakcije sa integrinima, pri čemu efekat, povećanje ili smanjenje adhezije, zavisi od prisutnih ekstracelularnih faktora [69]. Istraživanja su pokazala da galektin-8 može inhibirati ćelijsku adheziju kod određenih tipova ćelija; međutim, kada je imobilizovan, ovaj protein ima sposobnost da podstakne ćelijsko

vezivanje, ekspanziju i migraciju [81]. Tako je pokazano da galektin-8 stimuliše migraciju endotelnih ćelija goveđe aorte [74].

U preglednom radu Purić i saradnika, ukazano je na uloge galektina-8 u regulaciji progresije karcinoma i odbrani od bakterijskih i virusnih infekcija [76]. Sugerisano je da galektin-8 može stimulisati ekspresiju citokina i hemokina koji promovišu tumorigenezu, a sa druge strane može aktivirati citokinima-posredovani imunski odgovor koji inhibira napredovanje malignog procesa u zavisnosti od tipa ćelija [82]. Pored navedenog, u eksperimentalnim uslovima je pokazano da galektin-8 podstiče migraciju ćelijske linije glioblastoma U87 [78], a postoje i indikacije da povećana ekspresija galektina-8 može aktivirati mehanizme povezane sa povećanom agresivnošću tumorskih ćelija kod raka dojke [83].

1.7.2 Ligandi galektina-8

Kako je istaknuto u preglednom radu Troncoso i saradnika, galektin-8 se vezuje za različite integrine, a izbor liganda zavisi od integrinskog repertoara koji se eksprimira na površini određenog tipa ćelije [84]. U istraživanju Nishi i saradnika, proteini izolovani iz neutrofila koji interaguju sa galektinom-8 pokazali su da je integrin α M ligand za CRD u C-terminalnom regionu [85]. U istoj studiji je zabeleženo da dodatak galektina-8 modulira adheziju neutrofila. Pored toga, imobilizovan galektin-8 je takođe omogućio adheziju neutrofila, ali je broj adherentnih ćelija bio manji [85]. U drugoj studiji je pokazano da se u Jurkat T limfocitima galektin-8 vezuje za α 1-, α 3- i α 5 β 1 integrine i podstiče adheziju ćelija prvenstveno preko α 5 β 1 integrina, izazivajući reorganizaciju aktinskog citoskeleta u izraženu asimetričnu lamelipodiju [86]. Nadalje je pokazano da α 3 β 1 integrin, ekspimiran na H1299 ćelijama (nesitnoćelijski karcinom pluća) kao i u drugim tipovima ćelija, predstavlja primarni protein odgovoran za vezivanje galektina-8 [80]. Takođe je pokazano da se galektin-8 vezuje za antigen povezan sa funkcijom limfocita, LFA-1 (eng. *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*), koji učestvuje u adheziji leukocita i formiranju imunoloških sinapsi, te blokira njegovu interakciju sa ICAM-1 (intracelularnim adhezivnim molekulom-1, eng. *Intracellular Adhesion Molecule-1*) [87].

U istraživanju na krvnim pločicama čoveka pokazano je da se galektin-8 vezuje za određene glikane na njihovoj površini. Po vezivanju, on pokreće niz reakcija: krvne pločice migriraju, oslobađa se kalcijum, vezuje se fibrinogen i dolazi do njihovog međusobnog spajanja [88]. Pored toga, galektin-8 podstiče stvaranje molekula koji utiču na zgrušavanje krvi (poput tromboksana), ekspresiju P-selektina (deluje kao „molekularni lepak“) i izaziva oslobađanje sadržaja iz unutrašnjih granula krvnih pločica [88]. Kao ligandi galektina-8 identifikovani su glikoproteini α IIb i Ib-V koji su prisutni na krvnim pločicama [88]. Studije na pacijentima sa retkim poremećajima zgrušavanja (Glancmanova trombastenija i Bernard–Soulier sindrom) potvrdile su da je glikoprotein Ib ključan za prenos signala koje galektin-8 pokreće [88].

U ćelijama bubrega psa (MDCK ćelije, eng. *Madin–Darby canine kidney*) pokazano je da galektin-8 može da se veže za određene molekule na njihovoj površini – α 5 i β 1 integrinima i epidermalnim receptorom za faktor rasta (eng. *Epidermal Growth Factor Receptor* – EGFR) [89]. Kada se galektin-8 veže za integrin α 5 β 1 dolazi do aktivacije puta koji uključuje kinazu fokalnih adhezija (eng. *Focal Adhesion Kinase* – FAK) i EGFR, koji reguliše ćelijsku proliferaciju, migraciju, invaziju i preživljavanje [89]. Prekomerna ekspresija galektina-8 u ovim ćelijama dovodi do stimulacije proliferacije, migracije/invazije i razvoja pojačanih tumorigenskih sposobnosti aktivacijom FAK/EGFR puta [89].

U drugoj studiji sprovedena je identifikacija glikoproteinskih liganada u HL-60 ćelijama (humana leukemijska linija) [90]. Analiza je pokazala da su dva glavna liganda za galektin-8 CD45 (CD45RA i CD45RC, poznati i kao protein tirozin fosfataza, eng. *Protein Tyrosine Phosphatase* – PTP) i basigin (CD147) [90]. Ovi membranski glikoproteini sadrže modifikacije poli-N-

acetillaktozaminana N- i/ili O-glikanima, koje su neophodne za vezivanje galektina-8. Vezivanje galektina-8 za CD45 dovodi do njegove aktivacije i pokretanja različitih signalnih kaskada [90].

1.7.3 Galektin-8 u placenti i trofoblastnim ćelijama

Prisustvo galektina-8 je pokazano u normalnoj placenti čoveka prvog trimestra kao i u trofoblastnim ćelijskim linijama. Kolundžić i saradnici su imunohistohemijskom analizom utvrdili da je galektin-8 prisutan u vilusnom i ekstravilusnom trofoblastu placente prvog trimestra [91]. Pored toga, pokazano je i njegovo prisustvo u decidualnim stromalnim ćelijama i epitelnim ćelijama decidualnih žlezda. Galektin-8 je prisutan i u citoplazmi izolovanih citotrofoblastnih ćelija prvog trimestra i humanim trofoblastnim HTR-8/SVneo ćelijama [91]. Ovi rezultati zajedno sa dokazanom sposobnošću galektina-8 da modulira ćelijsku adheziju, migraciju, proliferaciju i ćelijsku smrt u drugim model sistemima, poput U87 ćelija glioblastoma [78], sugerišu potencijalnu ulogu ovog galektina u implantaciji embriona i obrazovanju funkcionalne placentе.

1.8 Galektini u patologijama trudnoće

Tokom trudnoće pokazano je prisustvo različitih galektina u placenti. U svim fazama trudnoće, počevši od koncepcije i implantacije pa sve do porođaja, glikozilacija proteina predstavlja proces od ključnog značaja [92]. Na osnovu pregleda koji su sproveli Blois i saradnici, ukazano je da galektini imaju višestruke funkcije u održavanju zdrave gestacije, uključujući i kontrolu imunskog sistema u uslovima infekcije [92]. Ipak, još uvek nije jasno kakvu tačnu funkciju galektini imaju u trenutku samog porođaja [92]. Galektini imaju ulogu u procesima placentacije i adaptacije majčinog organizma na trudnoću, pa se smatraju važnim faktorima za normalan tok gestacije [93]. Njihovo proučavanje tokom trudnoće je od izuzetnog značaja, jer učestvuju u različitim fiziopatološkim mehanizmima [93].

Prema rezultatima jedne studije, u placentama trudnoća komplikovanih preeklampsijom, galektin-1 i galektin-3 pokazuju pojačanu ekspresiju na membrani EVT ćelija [94]. Dodatno, pokazana je povećana ekspresija galektina-1 u decidualnom tkivu placentе povezanih sa HELLP (eng. *Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets*) sindromom koji uključuje pojavu hemolize, povišen nivo enzima jetre i snižen nivo krvnih pločica [94]. Ovi rezultati ukazuju na potencijalnu ulogu galektina u patogenezi poremećaja povezanih sa trudnoćom, naglašavajući njihovu važnost kao biomarkera i regulatornih molekula u komplikacijama gestacije.

1.8.1 Preeklampsija

Preeklampsija (PE) predstavlja jednu od najznačajnijih akušerskih komplikacija, javlja se u 2–8% trudnoća [95] i odgovorna je za preko 76.000 majčinskih i 500.000 fetalnih smrtnih ishoda godišnje globalno [96]. Preeklampsija je poremećaj u trudnoći koji se karakteriše novonastalom hipertenzijom, najčešće praćenom proteinurijom, sa ili bez teških kliničkih manifestacija [95]. Obično se pojavljuje posle 20. nedelje trudnoće i često se razvija pred sam kraj gestacije [95].

Preeklampsija se smatra patologijom placentе koja se razvija u dve faze [97]. Prva faza obuhvata abnormalnu placentaciju u ranom prvom trimestru trudnoće – posledica nedovoljno razvijene rane placentе i njenog snabdevanja majčinom krvlju, dok se druga faza javlja u kasnijem drugom i trećem trimestru i ispoljava se kao „maternalni sindrom“ – sve izraženija hipoksija placentе dovodi do kliničkih znakova kod majke [97,98]. Najčešće se javlja nakon 20. nedelje gestacije i uglavnom se dijagnostikuje pred kraj trudnoće [95]. Preeklampsija obuhvata spektar hipertenzivnih poremećaja u trudnoći, počevši od gestacione hipertenzije, koja može napredovati do razvoja težih formi, a u krajnjem slučaju može dovesti do izraženijih i ozbiljnijih manifestacija kao

što su eklampsija (pojava generalizovanih konvulzija kod žena sa PE) i HELLP sindrom [95,98]. Takođe se mogu razviti komplikacije kao što su moždani udar i diseminovana intravaskularna koagulacija, koje povećavaju rizik od smrtnog ishoda kod majke [96]. Kod umerene PE uglavnom nema izraženih simptoma, dok se kod teške PE usled izrazito visokog krvnog pritiska, mogu javiti glavobolja, bol u gornjem abdomenu ili poremećaj vida [98]. Preeklampsija, kao bolest posredovana poremećajima u placenti, povećava rizik i za plod [98]. Najčešće anomalije kod fetusa obuhvataju intrauterini zastoj rasta usled nedovoljne perfuzije kroz oštećenu placentu, kao i teškoće koje nastaju zbog prevremenog porođaja – spontanog ili indukovano radi zaštite majke i deteta [98].

Preeklampsija može izazvati teške komplikacije opasne po život i kod majke i kod ploda, uprkos tome što se trudnoća u mnogim slučajevima završava povoljno [98]. Iako su klinička slika, dijagnostički kriterijumi i pristupi u terapiji PE dobro poznati, njena osnovna etiologija ostaje nedovoljno razjašnjena [95]. Uteroplacentarna ishemija smatra se glavnim mehanizmom u nastanku PE i eklampsije [95], koja je posledica poremećaja u funkciji ćelija EVT, a PE, prema Goldman-Wohl i Yagel, nastaje usled nedovoljne invazije trofoblasta i spiralnih arterija koje ostaju sužene i neadaptirane [99,100].

Prema pregledu koji su objavili Pijnenborg i saradnici, neadekvatno remodelovanje spiralnih arterija nije karakteristično samo za PE, već i za druge komplikacije trudnoće, uključujući intrauterini zastoj u rastu, neproteinuričnu gestacijsku hipertenziju i hroničnu hipertenziju [101].

Postoji delikatna ravnoteža između prekomerne i nedovoljne invazije trofoblasta [102]. Alteracije u ćelijskim tipovima ili regulatornim faktorima koji kontrolišu invaziju EVT ćelija mogu značajno uticati na normalan tok trudnoće i dovesti do ozbiljnih komplikacija [102]. Zbog toga je neophodno detaljno ispitati sve faktore koji mogu uticati na funkciju i regulaciju EVT ćelija, kako bi se razumele njihove uloge u nastanku komplikacija poput PE.

1.8.1.1 Galektini u preeklampsiji

Ekspresija galektina-1, galektina-3 i Thomsen–Friedenreich (TF) antigena pokazuje značajno povećanje na membrani EVT u placentama pacijentkinja sa PE [94]. Takođe, u drugoj studiji je pokazano da su nivoi galektina-3, kao i FKBP (protein sličan FK506-vezivajućem proteinu, eng. *FK506-binding protein-like*), bili povećani kod pacijentkinja sa PE u cirkulaciji i placenti [103]. Posebno je istaknuta uloga PP13 (eng. *Placental Protein 13* – galektin-13), koji učestvuje u remodelovanju uterušnih arterija i vena tokom trudnoće [104]. Pregledni rad Gadde i saradnika ukazuje da sniženi nivoi PP13 u serumu predstavljaju značajan prediktor za razvoj PE i drugih akušerskih komplikacija, te da se PP13 može koristiti kao rani pokazatelj rizika od PE [105]. Takođe, Wang i saradnici su pokazali da galektin-14 podstiče migraciju i invaziju trofoblasta kroz intenziviranje EMT i povećanje ekspresije i aktivnosti MMP-9, čime se dodatno potvrđuje značajna uloga galektina-14 u ranoj trudnoći [106].

Istraživanja *in vitro* su pokazala da pojedini galektini, poput galektina-1 [107] i galektina-3 [108], mogu delovati kao proinvazivni autokrini i parakrini modulatori, potencijalno doprinoseći invaziji trofoblasta tokom rane trudnoće.

1.8.2 Gestacijske trofoblastne bolesti

Gestacijske trofoblastne bolesti (GTB) predstavljaju heterogenu grupu retkih patoloških stanja koja nastaju usled abnormalne proliferacije trofoblastnog tkiva. Ove bolesti se javljaju kao posledica poremećaja u razvoju gestacijskog tkiva i mogu imati benigni ili maligni tok. Hidatidiformna mola (HM), invazivna mola i horiokarcinom predstavljaju različite kliničke entitete unutar GTB spektra [109].

Hidatidiformna mola, poznata i kao molarna trudnoća, predstavlja specifičnu formu GTB koja potiče iz gestacijskog tkiva [110]. To je patološko stanje trudnoće koje nastaje usled

nekontrolisane proliferacije i invazije trofoblasta, koja se manifestuje kao kompletna forma (diploidna, androgenetička, bez embrionalnog/fetalnog tkiva) ili kao delimična forma (triploidna, diandrična, sa delimično formiranim fetusom) [111,112]. U većem delu sveta učestalost HM procenjuje se na približno 1 slučaj na 1.000 trudnoća [113]. Iako se najčešće ponaša benigno, HM nosi inherentni rizik od progresije ka malignim i invazivnim oblicima, uključujući invazivnu molu i horiokarcinom [110]. Kako je opisao Candelier u preglednom radu, struktura tkiva HM podseća na „grozd“ sa bobicama različite veličine, uz difuzno umnožavanje trofoblasta i naročito izmenjene, otečene resice [111]. Ova forma trudnoće je neodrživa i ne rezultira razvojem funkcionalnog embriona.

Invazivna mola predstavlja komplikaciju HM, pri kojoj trofoblastno tkivo invazivno prodire u miometrijum i okolne strukture. Iako histološki benigna, ponaša se lokalno agresivno i može izazvati ozbiljno krvarenje, pa čak i metastatsko širenje [114].

Horiokarcinom predstavlja retku, ali izrazito malignu formu GTB, koja nastaje kao posledica nekontrolisane proliferacije trofoblastnih ćelija. Horiokarcinom je izuzetno agresivnog karaktera, sa visokim malignim i invazivnim potencijalom i izraženom sklonošću ka široko rasprostranjenom metastaziranju [115]. Za razliku od HM i invazivne mole, horiokarcinom ne sadrži horionske resice, već je histološki sastavljen isključivo od malignih ćelija citotrofoblasta i sinciotrofoblasta [116]. Kod oko polovine slučajeva horiokarcinom nastaje iz kompletne HM koja ne sadrži fetalno tkivo [110]. Visoka smrtnost je posledica nedostatka rane dijagnoze i odgovarajuće terapije [110].

1.8.2.1 Galektini u GTB

U jednoj studiji je pokazano da je kod GTB značajan deo transformisanih trofoblastnih ćelija bio pozitivan na galektin-1 i galektin-3 [117]. Povećana imunoreaktivnost na ove proteine sugeriše da galektini mogu imati važnu ulogu u regulaciji invazivnog potencijala transformisanih trofoblastnih ćelija [117]. S obzirom na činjenicu da galektin-8 zauzima posebno mesto među galektinima zbog svoje jedinstvene strukture sa dva CRD, što mu omogućava interakciju sa širokim spektrom glikana i glikoproteinskih liganada, to ga čini važnim regulatorom ćelijske adhezije, migracije i imunoloških odgovora, pa se njegova funkcija sve više dovodi u vezu sa različitim patološkim stanjima. Učešće galektina-8 u patološkim procesima vezanim za trudnoću, posebno u GTB i PE do sada nije ispitivano.

Sumarno, iako je lokalizacija galektina-8 potvrđena u zoni interakcije majke i fetusa [91], njegova fiziološka funkcija tokom trudnoće još uvek nije ispitivana i razjašnjena. Dalja ispitivanja mogla bi razjasniti ulogu ovog galektina u procesima ključnim za formiranje funkcionalne placente, kao i njegov potencijalni značaj u patološkim stanjima vezanim za trudnoću, što je predmet ovog rada.

CILJ ISTRAŽIVANJA

Na osnovu ranijih istraživanja o ekspresiji galektina-8 u tkivu placente prvog trimestra trudnoće i to u ćelijama vilusnog i ekstravilusnog trofoblasta, kao i s obzirom na njegovu pokazanu ulogu u migraciji i invaziji različitih ćelijskih tipova, kao i u različitim patološkim stanjima, pretpostavlja se da ovaj lektin može imati značajnu ulogu u funkciji zdravog i patološki izmenjenog trofoblasta. Eksperimentalni rad u okviru ove doktorske disertacije je posvećen ispitivanju funkcijskog značaja galektina-8 u trofoblastu, kao i ispitivanju promena u njegovoj ekspresiji u patološkim stanjima koja uključuju trofoblast - malignoj transformaciji i preeklampsiji.

Na osnovu navedenog, postavljeni su sledeći ciljevi:

- Ispitivanje značaja galektina-8 u funkcijskim svojstvima trofoblasta čoveka *in vitro*, i to:
 - ispitivanje uticaja galektina-8 na preživljavanje trofoblasta i potencijalnu ulogu u zaštiti od DNK oštećenja;
 - ispitivanje značaja galektina-8 u adheziji, migraciji i invaziji;
 - ispitivanje uticaja galektina-8 na ekspresiju markera invazivnog fenotipa trofoblasta;
- Ispitivanje moguće promene u ekspresiji i unutar ćelijskoj lokalizaciji galektina-8 u ćelijama normalnog i maligno transformisanog trofoblasta - horiokarcinoma;
- Ispitivanje potencijalne promene u ekspresiji i lokalizaciji galektina-8 u tkivu placenti iz trudnoća komplikovanih preeklampsijom.

MATERIJAL I METODE

3.1 Trofoblastne ćelijske linije u kulturi

Za potrebe ove doktorske teze primenjene su trofoblastne ćelijske linije čoveka, uključujući imortalizovanu liniju ekstravilusnog trofoblata prvog trimestra HTR-8/SVneo (model normalnog ekstravilusnog trofoblata) i horiokarcinomske linije JAR i JEG-3.

3.1.1 HTR-8/SVneo ćelijska linija

HTR-8/SVneo je ćelijska linija ekstravilusnog trofoblata (EVT) čoveka, obezbeđena ljubaznošću dr Charles H. Graham (Queen's University, Kanada). Ove ćelije su generisane produžavanjem životnog veka trofoblata žene prvog trimestra trudnoće putem transfekcije velikim T antigenom virusa SV40 [118]. Utvrđeno je da transficirane HTR-8/SVneo ćelije poseduju fenotipske osobine slične primarnim trofoblastnim ćelijama iz kojih potiču [118]. Ove ćelije su korišćene za ispitivanje značaja galektina-8 za funkciju trofoblata čoveka *in vitro* i u ispitivanju diferencijalne ekspresije galektina-8 u ćelijskim linijama normalnog i maligno transformisanog trofoblata. Za kultivaciju HTR-8/SVneo ćelija korišćen je RPMI 1640 medijum (Biowest, Francuska) sa 10% fetalnim telećim serumom (eng. *Fetal Calf Serum* – FCS) (v/v, Biowest) i 1% antibiotika/antimikotika – penicilin G, streptomycin i amfotericin B (v/v, Capricorn Scientific, Nemačka), što zajedno predstavlja kompletan medijum za kultivaciju ovih ćelija. Ćelije su kultivisane u plastičnim Falcon flaskovima (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Inc., SAD) na temperaturi od 37 °C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂.

3.1.2 Horiokarcinomske ćelijske linije JAR i JEG-3

Pored HTR-8/SVneo ćelijske linije, koja predstavlja ćelije normalnog ekstravilusnog trofoblata čoveka, u eksperimentima su korišćene i humane horiokarcinomske ćelijske linije JAR (American Type Culture Collection – ATCC, SAD) i JEG-3 (European Collection of Authenticated Cell Cultures – ECACC, UK) radi komparativne analize lokalizacije i ekspresije galektina-8 u maligno izmenjenim ćelijama trofoblata. Za gajenje JAR ćelija korišćen je RPMI 1640 medijum sa 10% FCS i 1% antibiotika/antimikotika (kompletan medijum). Za gajenje JEG-3 ćelija korišćen je Dulbeccov modifikovani Eagle medijum (DMEM; Biowest), sa 10% FCS i 1% antibiotika/antimikotika (kompletan medijum). Ćelije su kultivisane u plastičnim Falcon flaskovima (Thermo Scientific) na temperaturi od 37 °C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂.

3.2 Tkivo placente

Za ovo ispitivanje su korišćeni uzorci tkiva placente nakon porođaj iz zdravih trudnoća i trudnoća komplikovanih PE, iz baze instituta INEP, prikupljenih u okviru naučne saradnje instituta INEP i i Ginekološko-akušerske klinike „Narodni front“ (GAK NF), a uz odobrenje Etičkog odbora GAK NF (broj odobrenja 05006-2018-17585). Istraživanje je odobreno od strane Etičke komisije za davanje odobrenja za korišćenje humanog materijala za potrebe naučnoistraživačkog rada instituta INEP (broj odobrenja 02-0136/3). Placentno tkivo je korišćeno za qPCR, Western blot i imunohistohemijsku analizu. Ukupno je za potrebe ove disertacije analizirano 9 placenti iz zdravih trudnoća i 10 placenti iz trudnoća komplikovanih PE.

3.3 Tretman ćelijske linije HTR-8/SVneo rekombinantnim humanim galektinom-8

Da bi se ispitao efekat galektina-8 na ćelije trofoblata, rekombinovani humani (rh) galektin-8 (R&D Systems, SAD) je dodavan ćelijama u RPMI 1640 medijumu koji sadrži 0,1% goveđi serumski albumin (eng. *Bovine Serum Albumin* – BSA) (w/v). Za sve eksperimente povezane sa

ovim tretmanom ćelije su prethodno kultivisane u svom odgovarajućem kompletnom medijumu u trajanju od 24 h, nakon čega su dva puta isprane fosfatnim puferom sa fiziološkim rastvorom (eng. *Phosphate Buffered Saline* – PBS, 0,05M, pH 7,2) i tretirane različitim koncentracijama rh galektina-8 (10, 50, 100 i 200 ng/ml) 24 h u vlažnoj atmosferi na 37 °C, u 5% CO₂.

3.4 Utišavanje *LGALS8* gena u HTR-8/SVneo ćelijama malim interferirajućim RNK

Da bi se ispitaio značaj endogenog galektina-8 za funkciju humanih trofoblastnih ćelija *in vitro*, gen *LGALS8* je utišan u HTR-8/SVneo ćelijama. Transfekcija je izvedena pomoću reagensa lipofektamin RNAiMAX (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., SAD), koristeći specifične male interferirajuće RNK (eng. *Small Interfering RNA* – siRNA) usmerene protiv iRNK za galektin-8, kao i negativnu kontrolnu siRNA (Ambion, Thermo Fisher Scientific Inc., SAD) [119]. Uspostavljene su tri eksperimentalne grupe ćelija – ćelije koje su tretirane samo lipofektaminom RNAiMAX (L), ćelije koje su transfekovane negativnom kontrolnom siRNA koja nema specifičnost ni prema jednoj humanoj RNK sekvenci (S) i ćelije transfekovane siRNA specifičnom za *LGALS8* iRNK (siGal-8). Konačna koncentracija siGal-8 i negativne kontrolne siRNA iznosila je 30 nM, dok je koncentracija lipofektamin RNAiMAX reagensa bila 0,25% (v/v). Lipofektamin RNAiMAX i siRNA su najpre razblaženi odvojeno u Opti-MEM™ medijumu (Gibco, UK), nakon čega su kombinovani i inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi. Dobijena kompleksna smeša je zatim pomešana sa kompletnim RPMI 1640 medijumom, tako da je konačna formulacija sadržala jednu trećinu Opti-MEM™ i dve trećine RPMI medijuma. Ćelije su u svim protokolima standardno inkubirane 72 h, osim u eksperimentima gde je drugačije naznačeno (npr. zimografija – 48 h).

3.5 Antitela

Različita primarna i sekundarna antitela korišćena u ovom istraživanju, zajedno sa njihovim specifičnim primenama i razblaženjima, prikazana su u **Tabeli 1** i **Tabeli 2**.

Tabela 1. Primarna antitela

Antigen	Poreklo i klonalnost	Razblaženje/koncentracija	Primena	Proizvođač
Galektin-8	Koza, poliklonско	1 µg/ml	Imunocitohemija i Western blot za ćelijsko frakcionisanje	R&D Systems, UK
Galektin-8	Miš, monoklonско	0,4 µg/ml	Western blot	Santa Cruz Biotechnology, USA
Galektin-8	Kunić, poliklonско	1:10000	Western blot	Assay Genie, Irska
		1:200	Imunohistohemija	
Integrin α1	Miš, monoklonско	1:400	CELISA	R&D Systems, UK
		1:5000	Western blot	
Integrin β1	Kunić,	1:500	CELISA	Millipore

	poliklonsko	1:5000	Western blot	Sigma, SAD
GAPDH	Kunić, monoklonsko	1:15000	Western blot	Cell Signaling Technology, SAD
β-aktin	Kunić, poliklonsko	1:6000	Western blot	Sigma- Aldrich, SAD
Citokeratin- 7	Miš, monoklonsko	1:100	Imunohistohemija	DAKO, Danska

Tabela 2. Sekundarna antitela

Antitelo	Razblaženje	Primena	Proizvođač
Anti-kunićevo IgG konjugovan sa enzimom peroksidazom rena (eng. <i>horseradish peroxidase</i> – HRP)	1:8000 za anti-galektin-8 antitela i 1:2000 za anti-GAPDH antitela	Western blot	Cell Signaling Technology, SAD
Anti-mišji IgG konjugovan sa HRP	1:2000	Western blot	Cell Signaling Technology, SAD
Anti-kozji IgG obeležen sa Alexa Fluor™ 488	1:4.000	Imunocitohemija	Molecular Probes, SAD
Anti-mišji IgG konjugovana sa avidin-biotin kompleksom	1:200	Imunohistohemija	Vector Laboratories, SAD
Anti-kunićevo IgG konjugovana sa avidin-biotin kompleksom	1:200	Imunohistohemija	Vector Laboratories, SAD

3.6 Određivanje broja vijabilnih i adherentnih ćelija

Ćelijska vijabilnost je analizirana primenom MTT testa (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid) (Sigma-Aldrich, SAD) [120,121].

Za potrebe ispitivanja uticaja rh galektina-8 na ćelijsku vijabilnost, HTR-8/SVneo ćelije su zasejane u ploče sa 96 bunara (2×10^4 ćelija po bunaru) i kultivisane u 100 µl kompletnog

medijuma 24 h. Čelije su potom isprane PBS puferom, nakon čega su inkubirane 24 h u 100 μ l medijumu sa različitim koncentracijama rh galektina-8 (10, 50, 100 i 200 ng/ml) i bez rh galektina-8 (kontrola). Po završetku tretmana, medijum je uklonjen, bunari su jednom isprani PBS puferom, a zatim je dodato 100 μ l rastvora MTT u PBS u koncentraciji od 0,5 mg/ml. Nakon inkubacije od 2 h na 37 °C formazanski kristali su rastvoreni u 100 μ l 10% SDS/0,01 N HCl po bunaru i inkubirani 24 h na 37 °C. Nakon rastvaranja boje, merena je optička gustina na 570 nm na čitaču za mikrotitarsku ploču (Epoch, BioTek, SAD). Eksperiment je ponovljen tri puta, uz šest tehničkih replikata po tretmanskoj grupi.

Za potrebe određivanja vijabilnosti nakon utišavanja *LGALS8* gena, HTR-8/SVneo ćelije su zasejane u ploče sa 96 bunara u gustini od 15×10^3 ćelija po bunaru i kultivisane u 100 μ l kompletnog medijuma. Nakon 24 h, ćelije su tretirane prema protokolu za utišavanje *LGALS8* gena. U svaki bunar je zatim dodato 10 μ l MTT rastvora koncentracije 5 mg/ml, a ploče su inkubirane 2 h na 37 °C. Dalji postupci su sprovedeni prema prethodno opisanoj proceduri. Eksperiment je ponovljen tri puta, uz četiri tehnička replikata po grupi.

3.7 Funkcionalni ćelijski testovi *in vitro*

3.7.1 Test ćelijske adhezije

Testovi ćelijske adhezije izvedeni su u pločama sa 96 bunara, neobloženim ili obloženim kolagenom tipa I (BD Biosciences, SAD) ili Matrigelom (BD Biosciences) u koncentraciji od 250 ng po bunaru. Obložene ploče su inkubirane 1 h na 37 °C, nakon čega su ploče blokirane sa 1% BSA u PBS 30 minuta na istoj temperaturi. Nakon blokiranja, ploče su isprane PBS.

HTR-8/SVneo ćelije su preinkubirane u RPMI 1640 medijumu sa 0,1% BSA sa ili bez tretmana (kontrola) tokom 1 h na 37 °C, uz povremeno mešanje. Čelije su tretirane različitim koncentracijama rh galektina-8 (10, 50, 100 i 200 ng/ml), sa ili bez dodatka 0,1 M laktoze – inhibitorom lektinskih interakcija, dok je kontrolna grupa bila bez rh galektina-8 i bez laktoze. Po 100 μ l preinkubirane ćelijske suspenzije koja je sadržala $2,5 \times 10^4$ ćelija je zasejano u ploče sa 96 bunara, inkubirano 2 h na 37 °C, nakon čega su bunari isprani u PBS, osušeni i ćelije fiksirane hladnim acetonom/metanolom (odnos 1:1) 10 minuta, osušene i čuvane na -20 °C sa desikantom do bojenja.

Za potrebe ispitivanja uticaja trofoblastnog galektina-8 na ćelijsku adheziju, HTR-8/SVneo ćelije su gajene u ploči sa 12 bunara, 24 h u koncentraciji od 3×10^5 ćelija po bunaru u 600 μ l kompletnog RPMI 1640 medijuma. Nakon inkubacije, medijum je uklonjen, a utišavanje gena sprovedeno prema protokolu za utišavanje *LGALS8* gena. Čelije su zatim odvojene pomoću 0,05% tripsina/0,02% EDTA i zasejane u prethodno pripremljene ploče u koncentraciji $2,5 \times 10^4$ ćelija po bunaru (L, S i siGal-8) kompletnog RPMI 1640 medijuma i inkubirane 2 h na 37 °C. Nakon inkubacije, bunari su isprani PBS-om, a ćelije fiksirane ledenim acetonom/metanolom (odnos 1:1) 10 minuta, osušene i čuvane na -20 °C sa desikantom do bojenja.

Kod oba tretmana, pričvršćene ćelije su obojene 0,05% rastvorom kristal ljubičastog (eng. *Crystal Violet* - CV) u 25% metanolu (50 μ l/bunar, 5 min). Broj adherentnih ćelija je određen CV testom. Nakon tretmana i ispiranja PBS-om, ćelije su osušene i fiksirane ledenim acetonom/metanolom (1:1) 10 min i obojene 0,05% rastvorom boje CV (Sigma, SAD) u 25% metanolu (50 μ l/bunar, 5 minuta). Višak boje je uklonjen ispiranjem ploča najmanje tri puta u dH₂O (destilovana voda). Nakon sušenja ploče na sobnoj temperaturi, inkorporirana boja rastvarana je 0,1 M natrijum citratom u 50% etanolu (100 μ l/bunar). Optička gustina je merena na 570 nm (Epoch). Intenzitet bojenja je bio proporcionalan prema broju pričvršćenih ćelija. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta sa po najmanje pet tehničkih replikata.

3.7.2 Test ćelijske migracije

Za ispitivanje migratornih sposobnosti trofoblasta *in vitro* korišćen je test „zarastanja rana“ (eng. *wound healing*). Ovim testom ispitivani su efekti različitih koncentracija rh galektina-8 (50, 100 i 200 ng/ml) na migraciju HTR-8/SVneo ćelija. Ćelije su zasejane u ploče sa 24 bunara, 3×10^5 ćelija/bunar u 400 μ l kompletnog medijuma i inkubirane do konfluentnosti. Ćelijski sloj je ogoljen pomoću sterilnog nastavka pipete, nakon čega su bunari isprani sterilnim PBS-om. Ćelije su inkubirane u RPMI 1640 medijumu koji sadrži 0,1% BSA, bez rh galektina-8 (kontrola), sa rh galektinom-8, ili sa rh galektinom-8 u prisustvu 0,1 M laktoze.

Takođe je ispitivan uticaj utišavanja *LGALS8* gena na migratorna svojstva HTR-8/SVneo ćelija. U ploče sa 24 mesta, ćelije su zasejane u koncentraciji od 1×10^5 ćelija/bunar u 300 μ l kompletnog medijuma i inkubirane 24 h. Nakon uklanjanja medijuma, utišavanje gena je sprovedeno prema navedenom protokolu, a ogoljena površina je napravljena kako je ranije opisano.

U slučaju oba tretmana, odabrana polja su fotografisana neposredno nakon formiranja ogrebotine sterilnim nastavkom (0 h) i nakon 24 h pomoću mikroskopa Olympus IX 73 (Olympus Optical Co., GmbH, Nemačka). Rastojanja koja su ćelije prešle nakon 24 h merena su pomoću elektronskog lenjira u ImageJ softveru (verzija 1.53t). Rezultati su prikazani kao procenat migracije tretiranih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu (koja je definisana kao 100%). Eksperimenti su ponovljeni tri puta, sa po dva tehnička replikata.

3.7.3 Test ćelijske invazije

Ćelijska invazija HTR-8/SVneo ćelija je ispitivana prema ranije opisanom protokolu [107]. Umetci za ćelijsku kulturu sa dijametrom pora 8 μ m (MilliporeSigma, SAD) obloženi su sa 10 μ l Matrigela sa smanjenim sadržajem faktora rasta, razblaženog u osnovnom RPMI 1640 medijumu do koncentracije 2,5 mg/ml, i inkubirani 30 minuta na 37 °C, kako bi došlo do geliranja Matrigela. U gornju komoru umetka nanošeno je 200 μ l HTR-8/SVneo ćelija (1×10^5) u osnovnom medijumu koji je sadržao 0,1% BSA sa ili bez tretmana (kontrola). Ćelije su tretirane rh galektinom-8 (200 ng/ml). U donji bunar dodato je 500 μ l istog medijuma. Test invazije trajao je 24 h na 37 °C. Nakon inkubacije, umetci su isprani sa PBS, a gornja površina filtera obrisana je štapićem sa pamučnim vrhom radi uklanjanja viška ćelija. Ćelije su fiksirane u ledeno hladnoj smeši acetona i metanola (odnos 1:1) tokom 10 minuta, a zatim obojene CV bojom. Broj invazivnih ćelija je određen prebrojavanjem ćelija na donjoj strani filtera i u porama, u uzastopnim poljima celog umetka. Rezultati su prikazani kao procenat u odnosu na prosečnu vrednost kontrolne grupe (koja je definisana kao 100%). Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta, sa po dva tehnička replikata.

Uticaj utišavanja ekspresije *LGALS8* gena na invazivna svojstva HTR-8/SVneo ćelija je ispitivan nakon utišavanja prema opisanom protokolu. U gornju komoru umetka, prethodno obloženog Matrigelom, nanošeno je po 200 μ l suspenzije sa 5×10^4 ćelija u kompletnom medijumu. Donji bunar je sadržao 500 μ l kompletnog RPMI medijuma. Test invazije je trajao 24 h na 37 °C, a dalji postupci sprovedeni su prema ranije opisanom protokolu. Eksperiment je ponovljen tri puta, sa po dva tehnička replikata.

3.8 Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction* - PCR) korišćena je za ispitivanje relativne ekspresije *LGALS8* gena u uslovima standardne kultivacije ćelija bez primene tretmana. HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3 ćelije su zasejane u ploče sa 24 bunara ($2,5 \times 10^5$ ćelija po bunaru), inkubirane 24 h u odgovarajućem kompletnom medijumu (300 μ l).

Ukupna RNK je izolovana iz HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3 ćelija korišćenjem TRIzol™ reagensa (Invitrogen) prema uputstvu proizvođača. Prvi lanac komplementarne DNK (cDNK) je

sintetisan iz 2 µg (za PCR) ili 1 µg (za kvantitativni PCR, eng. *quantitative PCR* – qPCR) ukupne RNK, koristeći 0,5 µg Oligo(dT) 12-18 prajmera, 250 µM svakog od 4 dNTP i 200 U RevertAid reverzne transkriptaze. PCR je izveden korišćenjem T100 termalnog ciklera aparata (Bio-Rad Laboratories, SAD). Svaki gen je amplifikovan u reakcionoj smeši od 25 µl koja sadrži 1 µl (za *GAPDH* analizu) ili 2 µl (za *LGALS8* analizu) cDNK, 200 µM svakog dNTP, 0,625 U AmpliTaq Gold DNA (Applied Biosystems, SAD) i 0,2 µM svakog prajmera (**Tabela 3**). Ekspresija gena *GAPDH* korišćena je za normalizaciju količine cDNK u reakcionoj smeši. Reakcije su započete denaturacijom na 95 °C u trajanju od 10 minuta, nakon čega je sprovedeno 40 ciklusa: denaturacija na 95 °C tokom 15 sekundi, hibridizacija prajmera na 56 °C tokom 30 sekundi i elongacija na 72 °C tokom 1 minuta. Na kraju je izveden završni korak elongacije na 72 °C u trajanju od 5 minuta. PCR amplikoni su razdvojeni elektroforezom na 1% agaroznom gelu sa dodatkom SYBR® Safe DNA boje (Thermo Scientific, SAD) i vizualizovani pod UV svetlom pomoću ChemiDoc MP Imaging System-a (Bio-Rad Laboratories).

Tabela 3. Sekvenca prajmera za PCR

Naziv gena	Gen	Sekvenca Prajmera
Galektin-8	<i>LGALS8</i>	F: AGAATGATGTTGTCCTTAAAC R: CTACCAGCTCCTTACTTCC
Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	<i>GAPDH</i>	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGT R: GAAGATGGTGATGGGATTTC

3.9 Kvantitativna PCR analiza

Kvantitativna PCR (qPCR) analiza korišćena je za ispitivanje relativne ekspresije:

- *LGALS8* gena u uslovima standardne kultivacije bez primene tretmana, ćelijske linije HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3 su inkubirane 24 h u odgovarajućem kompletnom medijumu.
- *ITGA1*, *ITGB1*, *MMP2* i *MMP9* gena u HTR-8/SVneo ćelijama nakon tretmana rh galektinom-8, dok je ekspresija *LGALS8* dodatno ispitivana nakon utišavanja putem siRNA radi potvrde efikasnosti postupka. U okviru tretmana rh galektinom-8 (50, 100, i 200 ng/ml), ćelije su prethodno zasejane u ploču sa 24 bunara u gustini od $2,5 \times 10^5$ ćelija po bunaru u 300 µl kompletnog medijuma. Utišavanje *LGALS8* gena pomoću siRNA sproveden je nakon zasejavanja ćelija u ploči sa 24 bunara, u gustini od 1×10^5 ćelija po bunaru, u zapremini od 300 µl kompletnog medijuma, prema protokolu za utišavanje.
- Pored toga, ekspresija *LGALS8* gena je analizirana u tkivu terminske placente nakon zdrave trudnoće i trudnoće komplikovane preeklampsijom. Iz tkiva placente, ukupna RNK je izolovana primenom TRIzol™ reagensa. Na uzorak tkiva je dodato 1 ml TRIzola, nakon čega je izvršena homogenizacija pri frekvenciji od 50 Hz tokom 15 minuta (TissueLyser LT, QIAGEN, Venlo, Holandija).

Za sintezu prvog lanca cDNK primenom reverzne transkripcije, upotrebljeno je 1 µg ukupne RNK. Reakcioni miks je sadržao 0,5 µg Oligo(dT) 12–18 prajmera (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Voltam, Masačusets, SAD), 250 µM svakog dNTP i 200 jedinica (U) RevertAid reverzne transkriptaze (Fermentas, Litvanija). Kvantitativna analiza ekspresije gena sprovedena je korišćenjem 7500 Real-Time PCR sistema (Applied Biosystems). Reakcioni miks za Real-Time PCR sadržao je 1 µg cDNK, 5 µl 2x SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), kao i

specifične direktne i reverzne prajmere u finalnoj koncentraciji od 0,5 μ M, prema specifikaciji prikazanoj u **Tabeli 4**. Za normalizaciju nivoa ekspresije *LGALS8* gena, u analizama ćelijskih linija korišćen je *GAPDH* gen kao referentni, dok je za analize ekspresije u tkivu termske placente primenjen *ACTB* gen. Za komparativne analize između različitih ćelijskih linija (HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3) i tkiva placente korišćena je $2^{-\Delta Ct}$ metoda. Kvantifikacija relativne ekspresije u ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo nakon tretmana (rh galektinom-8 ili utišavanjem *LGALS8* gena) sprovedena je primenom $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metode [122]. U ovoj metodi, ekspresija gena u eksperimentalnim grupama prikazana je kao stepen promene u odnosu na kontrolnu grupu, kojoj je dodeljena vrednost 1. Eksperimenti sa ćelijskim linijama izvedeni su najmanje tri puta, sa po dva tehnička replikata. Analize placentnog tkiva obuhvatile su osamnaest uzoraka termske placente, uključujući osam iz zdravih trudnoća i deset iz trudnoća sa preeklampsijom.

Tabela 4. Sekvenca prajmera za qPCR

Naziv gena	Gen	Sekvenca Prajmera
Integrin alfa 1 ($\alpha 1$)	<i>ITGA1</i>	F: 5'-GGTTCCTACTTTGGCAGTATT-3' R: 5'-AACCTTGTCTGATTGAGAGCA-3'
Integrin beta 1 ($\beta 1$)	<i>ITGB1</i>	F: 5'-GTGGTTGCTGGAATTGTTCTTATT-3' R: 5'-TTTTCCCTCATACTTCGGATTGAC-3'
Matriksna metaloproteinaza-2	<i>MMP2</i>	F: 5'-TGCGACCACAGCCAACTACG-3' R: 5'-ACAGACGGAAGTTCTTGGTGTAGG-3'
Matriksna metaloproteinaza-9	<i>MMP9</i>	F: 5'-TGACAGCGACAAGAAGTG-3' R: 5'-CAGTGAAGCGGTACATAGG-3'
Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	<i>GAPDH</i>	F: 5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGT-3' R: 5'-GAAGATGGTGTATGGGATTTTC-3'
Galektin-8	<i>LGALS8</i>	F: 5'-CTTAGGCTGCCATTCGCT-3' R: 5'-AAGCTTTTGGCATTGCA-3'
Beta-aktin	<i>ACTB</i>	F: 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3' R: 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'

3.10 Izolacija ćelijskih frakcija

Ćelijsko frakcionisanje HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3 ćelijskih linija, koje su prethodno kultivisane 24 h u odgovarajućem kompletnom medijumu (3×10^5 ćelija/bunar u 300 μ l medijuma u ploči sa 24 bunara), sprovedena je korišćenjem komercijalnog kompleta za ćelijsko frakcionisanje proteina iz kultivisanih ćelija (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc.), prema uputstvima proizvođača. Koncentracija proteina u dobijenim frakcijama — citosolnoj (C), membranskoj (M), nukleaunoj solubilnoj (Ns) i nukleusnoj hromatinskoj (Nh) — određena je primenom BCA (eng. *bicinchoninic acid*) setaza određivanje koncentracije proteina (Thermo Scientific, Thermo Fisher

Scientific Inc.) prema uputstvima proizvođača. Za elektroforezu (SDS-PAGE – eng. *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) korišćene su jednake količine proteina iz svake frakcije.

3.11 Western blot analiza

Proteini su razdvojeni elektroforetski na poliakrilamidnom gelu u denaturišućim i redukujućim uslovima primenom SDS-PAGE tehnike, a zatim su preneti na nitroceluloznu membranu (Western blot) radi semikvantitativne analize ekspresije proteina. Ova metoda je primenjena na ćelijske lizate (HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3), njihove ćelijske frakcije, kao i na uzorke placentnog tkiva. Za sve ćelijske linije, nakon završetka inkubacije ili tretmana bunari su isprani u PBS i dodat je pufer za uzorke – 1x Lemli pufer (0,0625 M Tris-HCl pufer, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 0,1% (v/v) bromfenol plavo i 5% 2-merkaptoetanol (v/v)) sa dodatim inhibitorom proteaza. Proteini u uzorcima su redukovani i denaturisani na 95°C tokom 5 minuta i centrifugirani na 17000 x g tokom 5 minuta na 4°C, kako bi se uklonio nerastvoran materijal, a uzorak supernatanta je zamrznut za Western blot analizu.

Za analizu ekspresije proteina galektina-8 u lizatima ćelija HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3, kao i u njihovim ćelijskim frakcijama u uslovima standardne kultivacije bez primene tretmana, ćelijske linije HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3 su inkubirane 24 h u odgovarajućem kompletnom medijumu (3×10^5 ćelija/bunar u 300 μ l medijuma u ploči sa 24 bunara). Nakon tretmana uzoraka sa 1x Lemli puferom (opisano ranije), proteini su razdvojeni na 10% poliakrilamidnim gelovima i preneti na nitroceluloznu membranu. Nespecifično vezivanje je blokirano inkubacijom membrana u 1% BSA u PBS-u 40 min, a potom je izvršena inkubacija sa anti-galektin-8 primarnim antitelom, preko noći na 4 °C, uz kontinuirano mešanje kako za uzorke ćelijskih frakcija, tako i za lizate ćelija (**Tabela 1**). Anti- β -aktin antitelo korišćeno je kao kontrola količine nanetog uzorka (**Tabela 1**). Nakon ispiranja tri puta sa PBS-Tween 0,05% i dva puta sa PBS, korišćeno je odgovarajuće sekundarno antitelo konjugovano sa enzimom peroksidazom rena (eng. *Horseradish Peroxidase* - HRP) (**Tabela 2**). Detekcija proteina izvršena je pomoću Pierce ECL Western Blotting supstrata (pojačana hemiluminiscencija eng. *Enhanced Chemiluminescence*; Pierce Biotechnology, SAD), a dobijeni signali su skenirani i kvantifikovani softverom ImageMaster TotalLab v2.01 (Amersham Biosciences, Inc., SAD). Eksperiment je izveden tri puta, sa po dva tehnička replikata u svakom ponavljanju.

Western blot je korišćen za polukvantitativno proučavanje ekspresije proteina galektina-8 i integrina $\alpha 1$ i $\beta 1$ na ćelijama HTR-8/SVneo sa utišanim *LGALS8* genom. Tretman utišavanja *LGALS8* gena primenom siRNA sproveden je nakon zasejavanja ćelija u gustini od 1×10^5 ćelija po bunaru, u zapremini od 300 μ l kompletnog medijuma, u ploči sa 24 bunara na 37 °C. Nakon tretmana uzoraka sa 1x Lemli puferom (opisano ranije), Western blot analiza je sprovedena korišćenjem poliakrilamidnih gelova različite koncentracije: 10% gel za razdvajanje galektina-8 i 7,5% gel za razdvajanje integrina. Nakon elektroforeze, uzorci su preneti na nitroceluloznu membranu, zatim blokirani pomoću 1% BSA u PBS ili 1% BSA u 0,05% PBS-Tween, nakon čega je usledila inkubacija sa primarnim antitelima na integrin $\alpha 1$, integrin $\beta 1$ ili galektin-8 preko noći na 4 °C (**Tabela 1**). Nakon ispiranja tri puta sa 0,05% PBS-Tween i dva puta sa PBS, korišćeno je odgovarajuće sekundarno antitelo (**Tabela 2**) konjugovano sa HRP, i inkubirano 1 h uz mućkanje. Koraci ispiranja su ponovljeni i primenjen je Thermo Scientific Pierce™ ECL supstrat za peroksidazu (Thermo Fisher Scientific Inc.) prema uputstvima proizvođača. Pre detekcije GAPDH, izvršen je postupak blagog skidanja antitela kako je opisano od strane Abcam (UK) [123] i ponovljen je opisani postupak imunodetekcije. Za vizuelizaciju specifičnog vezivanja korišćen je ChemiDoc MP Imager (Bio-RadSAD), a intenzitet proteinskih traka je meren denzitometrijskom

analizom pomoću programa ImageJ (1.54p). Eksperiment je sproveden tri puta, sa po dva tehnička replikata u svakom ponavljanju.

Radi analize ekspresije galektina-8 u tkivu terminske placente nakon zdrave trudnoće i trudnoće komplikovane preeklampsijom, proteini su izolovani iz organske frakcije koja sadrži proteine, nakon izolacije RNK pomoću TRIzolTM reagensa. Nakon prethodne izolacije RNK, koja je korišćena za qPCR, preostali DNK je uklonjen, a proteini su zatim izolovani u skladu sa prethodno opisanom metodom od strane Stevanović i saradnika [124]. Ukratko, aceton je korišćen za precipitaciju proteina, nakon čega su usledila tri ispiranja apsolutnim etanolom, sušenje, a zatim resuspendovanje u 1% SDS (w/v) na 50 °C, 70°C i konačno 90°C do 10 min. Zbog nemogućnosti potpune resuspenzije proteina, preostali talog je kratko centrifugiran, nakon čega je supernatant izdvojen i korišćen za dalju analizu. Koncentracije proteina su određena primenom BCA setaza određivanje koncentracije proteina prema uputstvima proizvođača. Na svaki uzorak je dodata odgovarajuća količina 2x koncentrovanog pufera za uzorke – 2x Lemli pufer (0,125 M Tris-HCl pufer, koji sadrži 4% SDS (w/v), 20% glicerola (v/v), 0,2% bromfenol plavog i 10% 2-merkaptioetanol (v/v) u jednakoj zapremini sa uzorkom, zatim zagrejani na 96 °C tokom 5 minuta i centrifugirani na 17,000 g, 5 minuta na 4 °C. Dobijeni proteini u uzorcima su redukovani i denaturisani, a uzorci supernatanta su zamrznuti za naknadnu Western blot analizu. Za razdvajanje putem SDS-PAGE korišćen je 10% gel i jednaka količina proteina po uzorku, 20µg. Nakon elektroforeze, uzorci su preneti na nitroceluloznu membranu i blokirani pomoću 1% BSA u 0,05% PBS-Tween na 60 min. Usledila je inkubacija sa primarnim antitelima na galektin-8 preko noći na 4°C (**Tabela 1**). Nakon ispiranja sa 0,05% PBS-Tween i PBS, membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima obeleženim HRP u 1% BSA u 0,05% PBS-Tween (**Tabela 2**) na 60 min. Koraci ispiranja su ponovljeni i upotrebljen je Thermo Scientific PierceTM ECL supstrat za peroksidazu (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD) prema uputstvu proizvođača. Za potrebe kontrole količine nanetog uzorka, membrane su podvrgnute proceduri uklanjanja vezanih primarnih antitela [120], i potom inkubirane sa primarnim anti-GAPDH antitelom (**Tabela 1**) i dalje tretirane na prethodno opisan način. Za vizuelizaciju specifičnog vezivanja, korišćen je ChemiDoc MP Imager, a intenzitet proteinskih traka je meren denzitometrijski i primenom ImageJ (1.54p). Analize su sprovedene na ukupno šesnaest uzoraka terminske placente — devet iz zdravih trudnoća i sedam iz trudnoća sa dijagnostikovanom preeklampsijom.

3.12 SDS-PAGE želatinska zimografija

Uticaj rh galektina-8 i utišavanja *LGALS8* gena na nivo MMP-2 i -9 ispitivan je SDS-PAGE želatinskom zimografijom. Želatinolitička aktivnost MMP-2 i MMP-9 određivana je semikvantitativno u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija tretiranih rh galektinom-8 i nakon utišavanja *LGALS8* gena. Za potrebe ispitivanja uticaja rh galektina-8 na HTR-8/SVneo ćelije, ćelije su prvo zasejane u gustini od 3×10^5 ćelija/bunar u 300 µl kompletnog medijuma u ploči sa 24 bunara 24 h. Nakon toga, HTR-8/SVneo ćelije su inkubirane 24 h na 37 °C u 300 µl medijumu za tretman koji sadrži različite koncentracije rh galektina-8 (50, 100 i 200 ng/ml), uključujući kontrolnu grupu (K) bez dodatog rh galektina-8. Za potrebe procene uticaja utišavanja *LGALS8* gena na nivo MMP, ćelije su zasejane u količini od 1×10^5 ćelija po bunaru (u kompletnom RPMI medijumu) u ploči sa 24 bunara tokom 24 h. Nakon toga, ćelijski medijum je uklonjen, dodat je tretman po opisanom protokolu utišavanja *LGALS8* i ćelije su inkubirane dodatnih 48 h. Bunari su dva puta isprani PBS-om i dodat je RPMI 1640 medijum bez seruma i inkubiran 24 h. Kondicionirani medijumi su centrifugirani i u njima je određena koncentracija proteina primenom BCA seta za određivanje koncentracije proteina prema uputstvima proizvođača.

Za razdvajanje proteina korišćen je 7,5% akrilamidni gel koji je sadržao 0,8 mg/ml želatina, u neredujućim uslovima. Proteinski uzorci su nanošeni u jednakim količinama za sve tretirane grupe. Uzorci kondicioniranih medijuma su sa $5 \times$ koncentrovanim puferom za uzorke (100 mM

Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 0.1% bromfenol plavo) u razmeri 4:1 i inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, proteini su razdvojeni elektroforezom na 10% SDS-poliakrilamidnom gelu. Da bi se uklonio SDS, gelovi su ispirani tri puta po 10 minuta u rastvoru koji je sadržao 2,5% Triton X-100. Sledeći korak obuhvatao je renaturaciju proteina u puferu (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) obogaćenom sa 5 mM CaCl₂ i 200 mM NaCl, pri čemu je inkubacija sprovedena na 37 °C tokom noći. Tokom ovog perioda dolazi do degradacije želatina usled proteolitičke aktivnosti MMP-2 i MMP-9. Gelovi su zatim bojeni 0,4% Coomassie Brilliant Blue – CBB (Merck KGaA, Nemačka) rastvorom u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon bojenja, gelovi su odbojavani rastvorom koji je sadržao 30% metanola i 10% glacijalne sirćetne kiseline, a zatim fotografisani korišćenjem ChemiDoc MP Imager. Aktivnost želatinaza se uočava kao obezbojena traka u plavo obojenom gelu, na mestu lokalizacije MMP u gelu. Nivo proteazne aktivnosti je određen denzitometrijskom analizom zimograma korišćenjem programa ImageMaster TotalLab v2.01. Eksperiment je urađen tri puta, sa po dva tehnička replikata u svakom ponavljanju.

3.13 ELISA

Kvantifikacija proteina TIMP-1 i TIMP-2 (tkivnih inhibitora metaloproteinaza) u HTR-8/SVneo ćelijama sa utišanim *LGALS8* genom sprovedena je primenom ELISA metode. Postupak tretiranja HTR-8/SVneo ćelija sproveden je prema ranije navedenoj proceduri za potrebe zimografije. Supernatanti ćelijske kulture bez seruma su sakupljeni nakon tretmana i čuvani na -20°C do analize. Procena nivoa TIMP-1 i TIMP-2 je procenjena korišćenjem odgovarajućih kompleta za humani enzimski imunotest prema uputstvima proizvođača (Human TIMP1 ELISA set, ab187394, i Human TIMP2 ELISA set, ab270213, oba od Abcam, UK). Ukratko, 50 µl svakog standarda i uzorka je dodato u odgovarajuće bunare, a zatim je dodato 50 µl smeše antitela za detekciju i vezujućih antitela i inkubirano je na sobnoj temperaturi 1 h uz blago mućkanje (400 o/min). Nakon ispiranja, u sve bunare je dodato 100 µl 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Nakon 10 minuta u mraku na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje (400 o/min), u svaki bunar je dodato 100 µl rastvora za prekidanje reakcije. Optička gustina je merena na 450 nm korišćenjem čitača (Wallac 1420 multilabel brojač Victor 3V). Eksperiment je urađen tri puta, sa po dva tehnička replikata u svakom ponavljanju.

3.14 Analiza faza ćelijskog ciklusa

Analiza faza ćelijskog ciklusa u HTR-8/SVneo ćelijama tretiranim rh galektinom-8 sprovedena je primenom protočne citometrije. HTR-8/SVneo ćelije su zasejane (2×10^5 ćelija/bunara) u ploče sa 24 bunara i kultivisane u 300 µl kompletnog medijuma u trajanju od 24 h. Nakon ispiranja u PBS, dodat je osnovni RPMI medijum bez seruma (300 µl), a potom su dodatnih 24 h ćelije kultivisane u RPMI medijumu sa 0,1% BSA bez ili sa rh galektinom-8 (50, 100 i 200 ng/ml). Nakon tretmana, HTR-8/SVneo ćelije su odvojene od ploča pomoću rastvora sa 0,05% tripsina i 0,02% EDTA, isprane dva puta u PBS, a zatim resuspendovane u 200 µl PBS. Uz konstantno mešanje, polako je dodato 3 ml ledeno hladnog 70% etanola. Ćelije su fiksirane 1 h na 4 °C i nakon toga dva puta isprane u PBS. Konačno, dodato je 500 µl rastvora propidijum jodida i distribucija ćelija kroz faze ćelijskog ciklusa je analizirana pomoću BD[®] LSR II protočnog citometra (Becton Dickinson, SAD). Eksperiment je urađen tri puta, sa po dva tehnička replikata u svakom ponavljanju.

3.15 Čelijski ELISA (cELISA) test

Čelijski ELISA test je korišćen za ispitivanje uticaja rh galektina-8 na ekspresiju integrina $\alpha 1$ i $\beta 1$ u HTR-8/SVneo ćelijama. HTR-8/SVneo ćelije su zasejane (2×10^4 ćelija/bunar) u ploče sa 96 bunara i kultivisane u 100 μ l kompletnog medijuma tokom 24 h. Nakon koraka ispiranja u PBS, HTR-8/SVneo ćelije su inkubirane 24 h u medijumu bez rh galektina-8 (kontrola) ili sa različitim koncentracijama rh galektina-8 (100 i 200 ng/ml) u 100 μ l 0,1% BSA u RPMI 1640 medijumu. Ćelije su dva puta isprane u PBS i fiksirane sa sveže pripremljenim, hladnim rastvorom acetona i metanola tokom 10 minuta. Nakon sušenja na vazduhu, ploče su čuvane na 4 °C sa desikantom sve do izvođenja postupka detekcije integrina korišćenjem specifičnih antitela. U svaki bunar je dodato 200 μ l PBS radi rehidracije ćelija, nakon čega je rastvor uklonjen. Potom je u svaki bunar dodato 100 μ l vodonik-peroksida (0,3% H_2O_2 u PBS), a ćelije su inkubirane 30 minuta u mraku radi blokade aktivnosti endogenih peroksidaza. Nakon ispiranja sa PBS, ćelije su tretirane sa 100 μ l 1% BSA u PBS tokom 30 minuta radi blokade nespecifičnog vezivanja, a zatim je rastvor uklonjen. Primarna anti-integrin $\alpha 1$ i anti-integrin $\beta 1$ antitela (**Tabela 1**) dodata su u svaki bunar (50 μ l/bunar) i inkubirana preko noći na 4 °C u vlažnoj komori. Nakon petostrukog ispiranja u PBS, u svaki bunar su dodata odgovarajuća sekundarna antitela (**Tabela 2**) obeležena HRP i inkubirana 1 h. Po završetku inkubacije, bunari su ponovo isprani pet puta u PBS, nakon čega su dodati supstrat i hromogen. Reakcija je zaustavljena dodatkom rastvora za prekidanje reakcije, a optička gustina je merena na talasnoj dužini od 450 nm (Epoch). Eksperiment je urađen tri puta, sa po dva tehnička replikata u svakom ponavljanju.

3.16 Komet test

Komet test je korišćen kao metoda za analizu genotoksičnih efekata rh galektina-8 na HTR-8/SVneo ćelije. Prvo, HTR-8/SVneo ćelije su zasejane (2×10^4 ćelija/bunar) u ploče sa 96 bunara i kultivisane u 100 μ l kompletnom medijumu 24 h. Nakon koraka ispiranja u PBS, ćelije su inkubirane 24 h u medijumu za tretman koji sadrži različite koncentracije galektina-8 (50, 100 i 200 ng/ml) u 100 μ l 0,1% BSA u RPMI medijumu bez seruma, uključujući kontrolnu grupu (K) bez tretmana. Kao pozitivna kontrola korišćen je H_2O_2 , pri čemu su ćelije inkubirane sa 30 μ M H_2O_2 u RPMI medijumu bez seruma tokom 30 minuta na 37 °C. Nakon tretmana, HTR-8/SVneo ćelije su odvojene od ploča primenom rastvora 0,05% tripsina i 0,02% EDTA i resuspendovane u 100 μ l kompletnog RPMI 1640 medijuma. Komet test je sproveden prema protokolu opisanom od strane Bruić i saradnika [125], sa manjim prilagođavanjima. Ukratko, 80 μ l suspenzije HTR-8/SVneo ćelija pomešano je sa 120 μ l agaroze sa niskom tačkom topljenja (Sigma-Aldrich) i naneto na mikroskopske staklene pločice prethodno obložene 1% agarozom sa standardnom tačkom topljenja (Sigma-Aldrich, Sent Luis). Preparati su prekriveni pokrovnim staklom i ostavljeni na 4 °C 10 minuta radi očvršćavanja. Nakon uklanjanja pokrovnog stakla, pločice su uronjene u hladni rastvor za liziranje (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 i 10% dimetilsulfoksid, pH 10) i inkubirane na 4 °C preko noći. Nakon inkubacije u rastvoru za liziranje, pločice su prenete u hladni elektroforetski rastvor (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) i inkubirane 30 minuta radi denaturacije DNK. Elektroforeza je zatim sprovedena na 25 V i 300 mA tokom 30 minuta. Po završetku elektroforeze, pločice su tri puta isprane sa PBS i obojene etidijum bromidom (20 μ g/ml). Mikroskopska analiza rezultata komet testa je izvršena 15 minuta nakon bojenja, na fluorescentnom mikroskopu IX 73 (Olympus Optical Co., GmbH, Hamburg) pri uvećanju od 100 \times . Procena oštećenja DNK sprovedena je prema metodi Andersona i saradnika [126]. Vizuelna analiza oštećenja DNK u HTR-8/SVneo ćelijama zasnivala se na kvantifikaciji migracije DNK iz jedra, pri čemu je formirani „rep“, predstavljao indikator stepena oštećenja. Izvršena je vizuelna klasifikacija kometa u pet kategorija, u skladu sa nivoom oštećenja DNK: (a) bez oštećenja, <5%; (b) nizak nivo oštećenja, 5–20%; (c) srednji nivo oštećenja, 20–40%; (d) visok nivo oštećenja, 40–95%; (e) totalno

oštećenje, >95%. Analiza je sprovedena na 100 ćelija sa svakog od 2 tehnička replikata. Oštećenje DNK je označeno kao migracija DNK preko 5% po jedru (zbir klasa kometa b + c + d + e) i vrednosti su prikazane kao ukupan procenat ćelija sa oštećenjem DNK. Eksperiment je urađen tri puta, sa po dva tehnička replikata u svakom ponavljanju.

3.17 Imunocitohemija

Imunocitohemijskom analizom ispitivana je ekspresija i lokalizacija galektina-8 u HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3 ćelijama. Sve ćelijske linije su prvo kultivisane na pokrovnim staklima u petri šoljama prečnika 60 mm (6×10^5 ćelija u 4 ml kompletnog odgovarajućeg medijuma) tokom 24 h na 37 °C. Nakon inkubacije, petri šolje su isprane u PBS, osušene i ćelije su fiksirane u ledenoj hladnoj smeši acetona i metanola (odnos 1:1) tokom 10 minuta, ponovo osušene i čuvane na -20 °C sa desikantom do bojenja. Prilikom imunocitohemijske analize na pokrovna stakla je dodat PBS radi rehidracije ćelija, nakon čega je rastvor uklonjen. Zatim su ćelije inkubirane u 1% BSA rastvorenim u PBS tokom 30 minuta, kako bi se blokiralo nespecifično vezivanje. Nakon inkubacije, ćelije su inkubirane u rastvoru primarnog anti-galektin-8 antitela (**Tabela 1**) preko noći na 4 °C u vlažnoj komori. Imunofluorescentno obeležavanje je izvršeno primenom sekundarnog anti-kozjeg antitela konjugovanog sa fluoroforom AlexaFluor 488 (Molecular Probes, Thermo Scientific, SAD) 30 min na sobnoj temperaturi u mraku (**Tabela 2**). Preparati su zatim montirani u VECTASHIELD medijumu sa dodatkom DAPI (Vector Laboratories, SAD) boje radi kontrastnog obeležavanja jedara. Mikroskopska analiza izvršena je pomoću fluorescentnog mikroskopa Axio Imager, opremljenog AxioCam HR kamerom (Carl Zeiss, Nemačka).

3.18 Imunohistohemija

Imunohistohemijskom analizom ispitivana je ekspresija proteina galektina-8 u terminskoj placenti nakon zdrave trudnoće i trudnoće komplikovane preeklampsijom. Tkiva terminske placentе uzeta neposredno nakon porođaja, fiksirana su u 4% formaldehidu (neutralni puferisani formalin), nakon čega su dehidratisana kroz seriju rastućih koncentracija etanola (70%, 95% i 100%), a potom smešama etanola i ksilola u odnosu 70:30 i potom 30:70, zaključno sa 100% ksilolom. Nakon toga, uzorci su ukalupljeni u parafin i sečeni na debljinu od 4 µm pomoću mikrotoma. Za potrebe imunohistohemijske analize, parafinski preseći su deparafinizovani ksilolom, zatim rehidrirani kroz apsolutni etanol i 70% etanol koji je sadržao 0,3% H₂O₂ radi blokade aktivnosti endogene peroksidaze. Preparati su zatim isprani u 70% etanolu, destilovanoj vodi i PBS i inkubirani u 1% BSA u PBS tokom 30 minuta, radi blokiranja nespecifičnog vezivanja. Primarna antitela — anti-galektin-8 poreklom iz kunića (Assay Genie) i anti-citokeratin-7 poreklom iz miša (DAKO, Glostrup, Danska) – razblažena su u 1% BSA u PBS i naneta na tkiva, uz inkubaciju preko noći na 4 °C u vlažnoj komori (**Tabela 1**). Nakon ispiranja u PBS, naneta su sekundarna antitela specifična na kunićeve i mišje IgG (Vector Laboratories, Njuark, Kalifornija, SAD), konjugovana sa avidin-biotin kompleksom (**Tabela 2**), uz inkubaciju od 30 minuta. Nakon ponovnog ispiranja u PBS, nanet je avidin-biotin kompleks (Vector Laboratories, SAD) u trajanju 30 minuta. Nakon ispiranja u PBS i destilovanoj vodi, bojenje je izvršeno primenom DAB (3, 3'-diaminobenzidin; Vector Laboratories) hromogena i DAB supstrata prema uputstvu proizvođača, sve dok se nije razvila specifična bojena reakcija, nakon čega su preparati isprani vodom. Nakon postepene dehidracije u apsolutnom etanolu i ksilolu, preparati su zatim montirani u VECTASHIELD medijumu za trajno montiranje. Mikroskopska analiza sprovedena je pomoću mikroskopa IX 73 (Olympus Optical Co., GmbH). Kontrolni uzorci su inkubirani bez prisustva primarnih antitela, što je rezultovalo odsustvom bojene reakcije.

3.19 Statistička analiza

Analiza podataka je urađena korišćenjem GraphPad Prism Demo v.5 programa, (GraphPad Software, Inc., SAD). Za statističku analizu je korišćena jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) koja je u slučaju statističke značajnosti praćena Takijevim post hoc testom ($\alpha = 0,05$) ili t-test. Vrednosti su smatrane statistički različitim kada je $p < 0,05$.

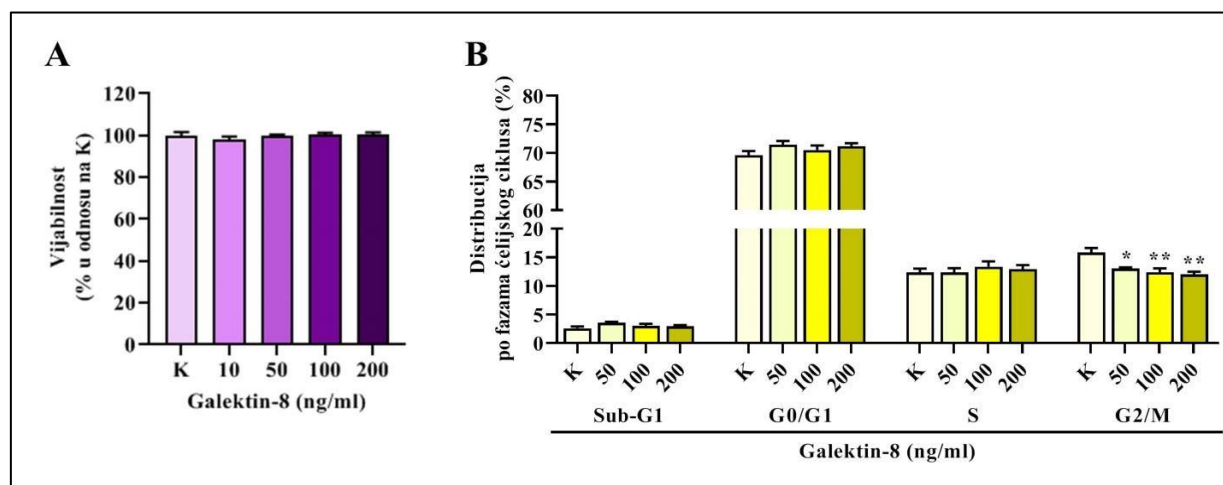
REZULTATI

4.1 Uticaj rh galektina-8 na ćelije trofoblasta

U ovom istraživanju ispitivan je značaj galektina-8 na funkcionalna svojstva EVT korišćenjem HTR-8/SVneo ćelija. Za potrebe ispitivanja uticaja egzogenog galektina-8, HTR-8/SVneo ćelije su tretirane rh galektinom-8 u različitim koncentracijama, nakon čega je ispitivan njegov uticaj na ćelijsko preživljavanje i funkcionalna svojstva ovih ćelija.

4.1.1 Uticaj rh galektina-8 na ćelijsku vijabilnost i raspodelu ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

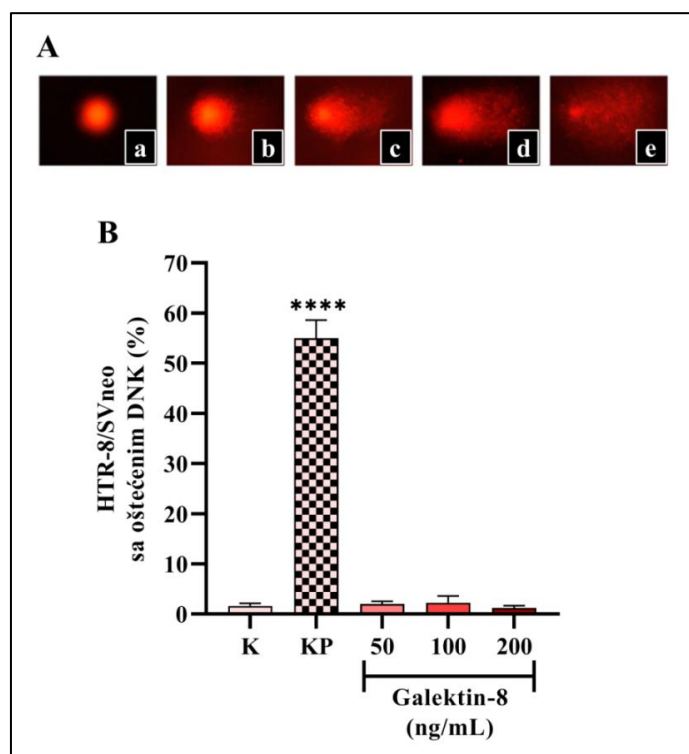
Uticaj rh galektina-8 na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija je ispitivan primenom MTT testa. Dobijeni rezultati ukazuju da rh galektin-8, u koncentracijama od 10, 50, 100 i 200 ng/ml u trajanju od 24 h nije imao značajan efekat na ćelijsku vijabilnost u poređenju sa netretiranom kontrolom, K (Slika 9A). Srednje vrednosti ćelijske vijabilnosti u odnosu na K \pm SEM su: 100% \pm 1.6 za K; 98,1% \pm 1,4 za 10 ng/ml; 99,7% \pm 0,7 za 50 ng/ml; 100,4% \pm 1,0 za 100 ng/ml; 100,5% \pm 1,0 za 200 ng/ml). Dalje je ispitivan uticaj rh galektina-8 na raspodelu ćelija po fazama ćelijskog ciklusa (Slika 9B). Uočeno je da tretman rh galektinom-8 u koncentracijama od 50, 100 i 200 ng/ml ne dovodi do značajnih promena u zastupljenosti ćelija sub-G1, G0/G1 i S fazi ćelijskog ciklusa u poređenju sa netretiranom kontrolom. Međutim, u G2/M fazi zabeleženo je statistički značajno smanjenje broja ćelija za sve testirane koncentracije. Procenat ćelija u G2/M fazi se sa 15,8% u kontrolnoj grupi smanjio na 13,0% ($p < 0,05$), 12,4% ($p < 0,01$) i 12,0% ($p < 0,01$) nakon tretmana sa 50, 100 odnosno 200 ng/ml. Srednje vrednosti \pm SEM za K, 50, 100 i 200 ng/ml su redom: za sub-G1 fazu 2.6% \pm 0.3, 3.5% \pm 0.2, 3,0% \pm 0.4, 2.9% \pm 0.2; za G0/G1 fazu: 69.6% \pm 0.7, 71.4% \pm 0.7, 70.5% \pm 0.8, 71.2% \pm 0.5; za S fazu: 12.3% \pm 0.7, 12.3% \pm 0.8, 13.3% \pm 1, 12.9% \pm 0.7; za G2/M fazu: 15.8% \pm 0.8, 13,0% \pm 0.2, 12.4% \pm 0.7, 12,0% \pm 0.5.



Slika 9. Efekat egzogenog rh galektina-8 na vijabilnost i ćelijski ciklus HTR-8/SVneo ćelija. (A) Uticaj rh galektina-8 na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija. Rezultati su izraženi kao procenat u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu (K) i prikazani su kao srednja vrednost + SEM. Eksperiment je ponovljen četiri puta, sa po šest tehničkih replikata. (B) Uticaj rh galektina-8 na raspodelu ćelija po fazama ćelijskog ciklusa (sub-G1, G0/G1, S i G2/M) analiziran je metodom protočne citometrije. Rezultati su prikazani kao procenat ćelija u pojedinačnoj fazi ciklusa + SEM. Eksperimenti su ponovljeni tri puta, sa po tri tehnička replikata. K – netretirana kontrolna grupa. Statistički značajne razlike u odnosu na K označene su sledećim oznakama: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.1.2 Procena genotoksičnog efekta rh galektina-8 na HTR-8/SVneo ćelije

Potencijalni genotoksični efekti tretmana rh galektinom-8 u koncentracijama od 50, 100 i 200 ng/ml u trajanju od 24 h, ispitivani su pomoću alkalnog komet testa. Dobijeni rezultati (**Slika 10B**) ukazuju na odsustvo genotoksičnih efekata, budući da nije zabeležena statistički značajna promena u procentu ćelija sa oštećenjem DNK u poređenju sa netretiranom kontrolnom grupom. Tretman ćelija vodonik-peroksidom (KP) je korišćen kao pozitivna kontrola zbog svoje dokazano genotoksične aktivnosti putem oksidativnog oštećenja DNK. Srednje vrednosti \pm SEM za K, KP, 50, 100 i 200 ng/ml redno su: 1.6% \pm 0.5; 55% \pm 3.6 ($p < 0,0001$); 2% \pm 0.5; 2.3% \pm 1.3; 1.2% \pm 0.5. Vizuelna klasifikacija komete, koja odražava stepen oštećenja DNK, prikazana je na **slici 10A**.

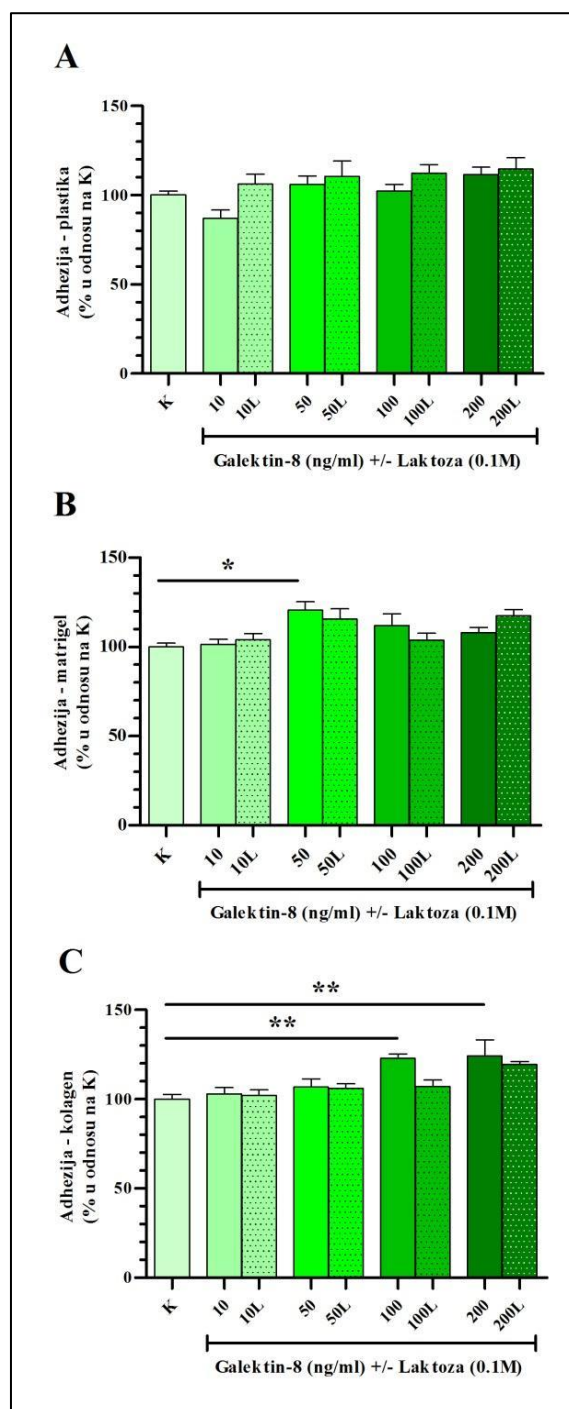


Slika 10. Genotoksični efekat rh galektina-8 u HTR-8/SVneo ćelijama analiziran komet testom. (A). Reprezentativne mikrografije na nivou fluorescentne mikroskopije koje prikazuju klase formirane na osnovu stepena oštećenja DNK: a – bez oštećenja, b – nisko, c – srednje, d – visoko i e – potpuno oštećenje DNK. **(B)** Efekat egzogeno primenjenog rh galektina-8 na oštećenje DNK u HTR-8/SVneo ćelijama. Rezultati su prikazani kao procenat ćelija sa detektovanim oštećenjem DNK, izraženi kao srednja vrednost + SEM. K – netretirana kontrolna grupa, KP – pozitivna kontrolna grupa tretirana sa H₂O₂. Eksperimenti su ponovljeni tri puta, sa po dva tehnička replikata. Statistički značajne razlike označene su sa **** $p < 0,0001$.

4.1.3 Efekat rh galektina-8 na adheziju HTR-8/SVneo ćelija

Za potrebe ispitivanja ćelijske adhezivnosti, HTR-8/SVneo ćelije u suspenziji su pretretirane rh galektinom-8 u koncentracijama od 10, 50, 100 i 200 ng/ml, nakon čega su zasejane na tri vrste podloge – plastiku, Matrigel ili kolagen tipa I i ostavljene da adheriraju u trajanju od 2h. Tretman rh galektinom-8 u navedenim koncentracijama nije doveo do statistički značajnih promena u adheziji ćelija HTR-8/SVneo za plastiku u poređenju sa netretiranom kontrolom (**Slika 11A**). Srednje vrednosti adhezije na plastiku \pm SEM za K, 10, 10L, 50, 50L, 100, 100L, 200, 200L ng/ml redom su: 100,0% \pm 2,3; 87,1% \pm 4,6; 106% \pm 5,4; 102,3% \pm 4,9; 111,5% \pm 8,6; 106,2% \pm 3,8; 110,6% \pm 4,8; 112,2% \pm 4,1; 114,6% \pm 6,4. Sa druge strane, rh galektin-8 pokazao je stimulativan efekat na adheziju HTR-8/SVneo ćelija za Matrigel (**Slika 11B**). Najveće povećanje adhezije zabeleženo je

pri koncentraciji od 50 ng/ml, gde je došlo do povećanja ćelijske adhezija na 120,6% u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu, K ($p < 0,05$). Kotretman laktozom, inhibitorom lektinskih interakcija, neutralisao je stimulatívni efekat galektina-8 na adheziju ćelija za ovaj tip podloge. Srednje vrednosti adhezije na Matrigel \pm SEM za K, 10, 10L, 50, 50L, 100, 100L, 200, 200L ng/ml redom su: 100,0% \pm 2,1; 104,0% \pm 3,5; 120,6% \pm 3,5; 115,7% \pm 5,6; 111,9% \pm 6,7; 103,7% \pm 4,0; 103,7% \pm 4; 108,0% \pm 3,0; 117,5% \pm 3,4. Sličan obrazac zapažen je u slučaju adhezije HTR-8/SVneo ćelija za kolagen tipa I (**Slika 11C**), gde je rh galektin-8 doveo do povećanja ćelijske adhezije na 122,8% pri koncentraciji od 100 ng/ml i 124,2% pri koncentraciji od 200 ng/ml ($p < 0,01$ i $< 0,01$ redom). Prisustvo laktoze eliminisalo je stimulatívni efekat galektina-8, što dodatno ukazuje na to da je pokazano povećanje adhezije pri posredovano lektinskim interakcijama. Srednje vrednosti adhezije na kolagen tipa I \pm SEM za K, 10, 10L, 50, 50L, 100, 100L, 200, 200L ng/ml redom su: 100% \pm 2,6; 102,9% \pm 3,6; 102,2% \pm 3; 106,7% \pm 4,7; 106,1% \pm 2,5; 122,8% \pm 2,5; 107,2% \pm 3,5; 124,2% \pm 9; 119,5% \pm 1,5.



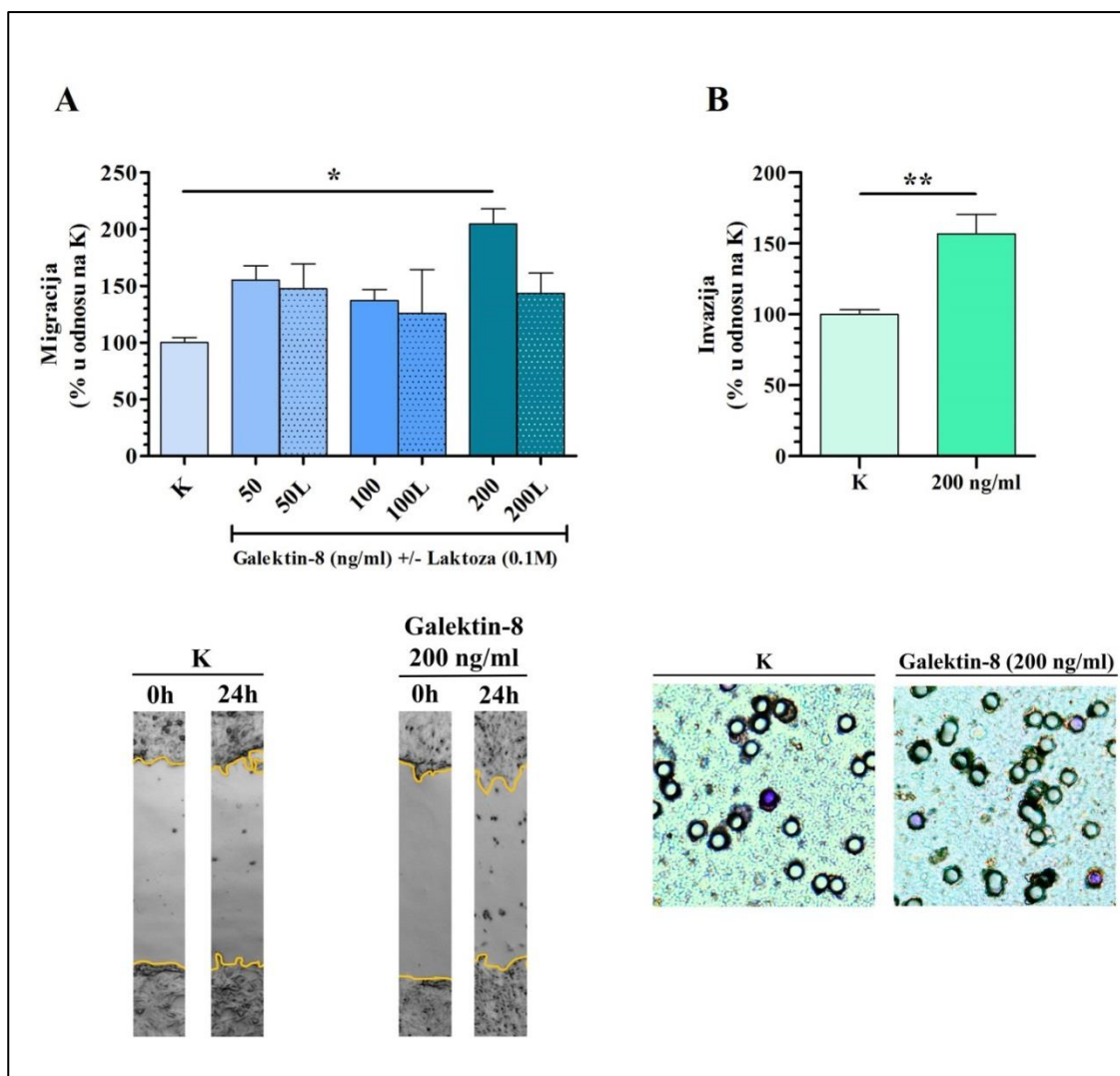
Slika 11. Efekat rh galektina-8 na adheziju HTR-8/SVneo ćelija za plastiku (A), Matrigel (B), i kolagen tipa I (C). Rezultati su izraženi kao procenat u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu (K) i prikazani su kao srednja vrednost + SEM. Laktoza (L) u koncentraciji od 0,1 M korišćena je kao kompetitivni inhibitor lektinskih interakcija. Eksperimenti su ponovljeni tri puta, sa po tri tehnička replikata. Statistički značajne razlike označene su sledećim oznakama: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.1.4 Uticaj rh galektina-8 na migraciju i invaziju HTR-8/SVneo ćelije

Za potrebe ispitivanja hipoteze da galektin-8 može delovati kao parakrini regulator invazije trofoblasta, sproveden je *in vitro* eksperiment u kojem su HTR-8/SVneo ćelije tretirane rh galektinom-8. Analiza ćelijske migracije pokazala je da tretman rh galektinom-8 značajno stimuliše ćelijsku migraciju, pri čemu je najizraženiji efekat zabeležen pri koncentraciji od 200 ng/ml —

povećanje na 204,8% vrednosti u poređenju sa netretiranom kontrolom ($p < 0,05$), što je prikazano na **slici 12A**. Primena laktoze je poništila stimulatívni efekat rh galektina-8, što ukazuje na specifičnost interakcije između galektina-8 i njegovih liganada. Srednje vrednosti testa migracije \pm SEM za K, 50, 50L, 100, 100L, 200, 200L ng/ml redom su: 100,0% \pm 4,4; 155,2% \pm 12,7; 147,6% \pm 22,0; 136,9% \pm 9,8; 125,6% \pm 38,8; 204,8% \pm 13,3; 143,4% \pm 18,0.

Na osnovu ovih rezultata, tretman rh galektinom-8 pri koncentraciji od 200 ng/ml korišćen je za procenu njegovog uticaja na invazívni kapacitet trofoblastnih ćelija. Tretman je doveo do značajnog povećanja invazije ćelija HTR-8/SVneo na 156,7% u poređenju sa netretiranom kontrolom ($p < 0,01$), što je prikazano na **Slici 12B**. Srednje vrednosti testa invazije \pm SEM za K i 200 ng/ml redom su: 100,0% \pm 3,2 i 156,7% \pm 13,8.



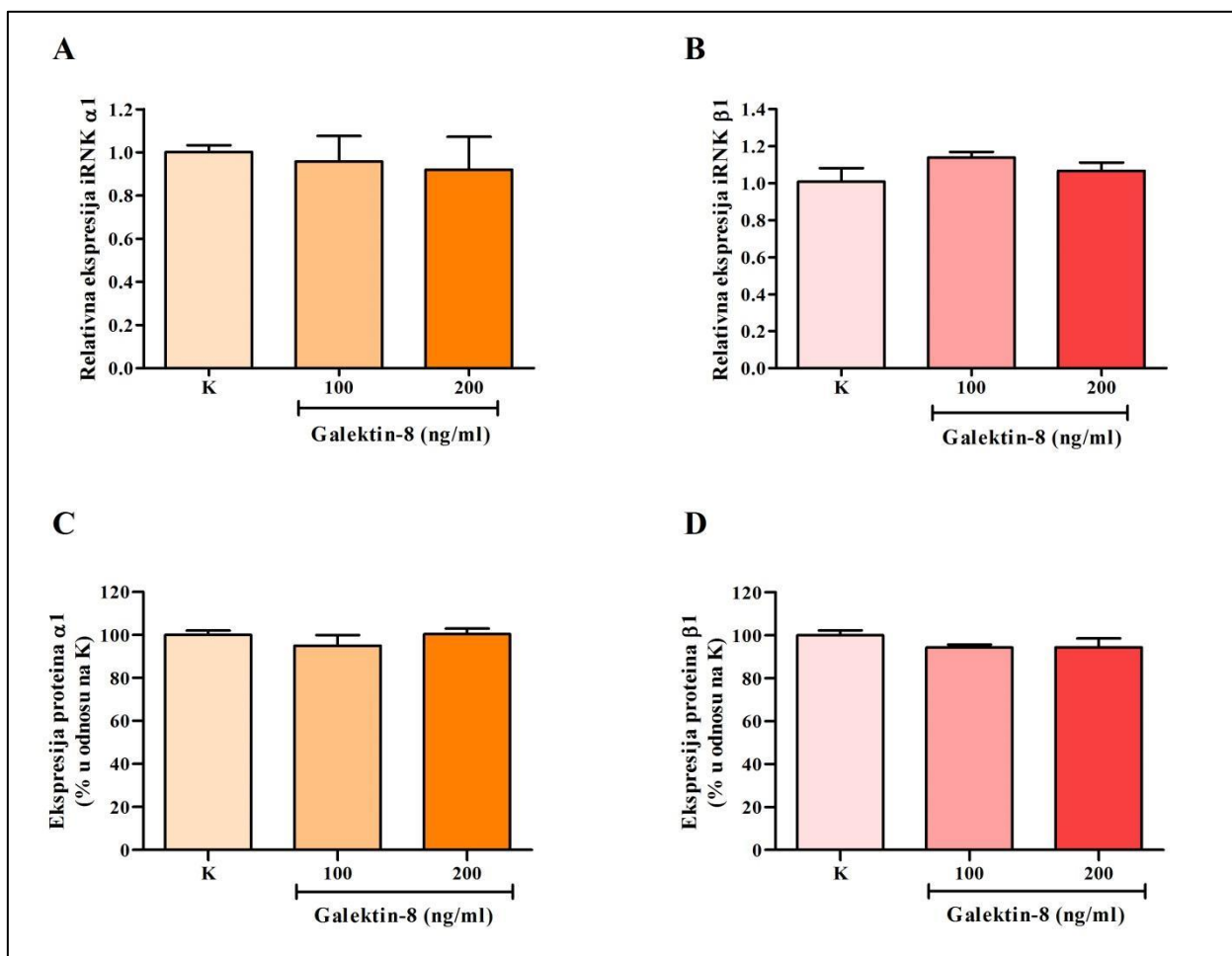
Slika 12. Efekat rh galektina-8 sa i bez prisustva laktoze na migraciju i invaziju trofoblastnih ćelija. (A) Efekat rh galektina-8, u prisustvu ili odsustvu 0,1 M laktoze (L), na migraciju HTR-8/SVneo ćelija. (B) Efekat egzogeno dodatog rh galektina-8 na invaziju HTR-8/SVneo ćelija. Rezultati su izraženi kao procenat u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu (K) i prikazani su kao srednja vrednost + SEM. Kontrolna grupa (K) predstavlja netretirane ćelije. Eksperimenti su sprovedeni tri puta u duplikatu. Statistička značajnost označena je kao * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.1.5 Analiza efekta rh galektina-8 na ekspresiju integrinskih subjedinica $\alpha 1$ i $\beta 1$ u HTR-8/SVneo ćelijama

Uticaj rh galektina-8 na ekspresiju integrinskih subjedinica $\alpha 1$ i $\beta 1$ u HTR-8/SVneo ćelijama, ispitivan je na nivou iRNK i proteina. Integrin $\alpha 1\beta 1$ predstavlja receptor za laminin i kolagen, te ima ključnu ulogu u procesu invazije trofoblasta kroz ECM [127].

Ekspresija gena za integrinske subjednice $\alpha 1$ i $\beta 1$ analizirana je qPCR metodom nakon tretmana ćelija rh galektinom-8 u koncentracijama od 100 i 200 ng/ml u trajanju od 24 h. Dobijeni rezultati nisu pokazali značajne promene u nivou iRNK u poređenju sa netretiranom kontrolom, K (Slika 13A i 13B). Srednje vrednosti stepena promene u odnosu na K za integrin $\alpha 1 \pm$ SEM za K, 100 i 200 ng/ml redom su: $1,00 \pm 0,03$; $0,96 \pm 0,12$; $0,92 \pm 0,15$; dok su za integrin $\beta 1 \pm$ SEM za K, 100 i 200 ng/ml redom: $1,00 \pm 0,07$; $1,14 \pm 0,03$; $1,07 \pm 0,04$.

Dodatno, rh galektin-8 nije imao značajan uticaj na ekspresiju subjedinica integrina $\alpha 1$ i $\beta 1$ na proteinskom nivou, što je utvrđeno primenom ELISA testa na ćelijama (Slika 13C i 13D). Srednje vrednosti ekspresije proteina $\alpha 1$ u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu (K) \pm SEM za K, 100 i 200 ng/ml redom su: $100,0\% \pm 2,1$; $95,0\% \pm 5,0$; $100,4\% \pm 2,6$, dok su za $\beta 1$: $100,0\% \pm 2,3$; $94,2\% \pm 1,4$; $97,9\% \pm 3,5$.



Slika 13. Efekat rh galektina-8 na ekspresiju integrinskih subjedinica $\alpha 1$ i $\beta 1$. Ekspresija integrinskih subjedinica (A) $\alpha 1$ i (B) $\beta 1$ na nivou iRNK analizirana je u ćelijama HTR-8/SVneo nakon tretmana rh galektinom-8. Rezultati su prikazani kao relativni nivoi ekspresije iRNK u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu, K, dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta sprovedena u duplikatu, i predstavljani kao srednja vrednost + SEM. Dodatno, efekat rh galektina-8 na ekspresiju proteina integrinskih subjedinica $\alpha 1$ i $\beta 1$ u ćelijama HTR-8/SVneo ispitivan je primenom ćelijskog ELISA (cELISA) testa (C i D). Rezultati su izraženi kao

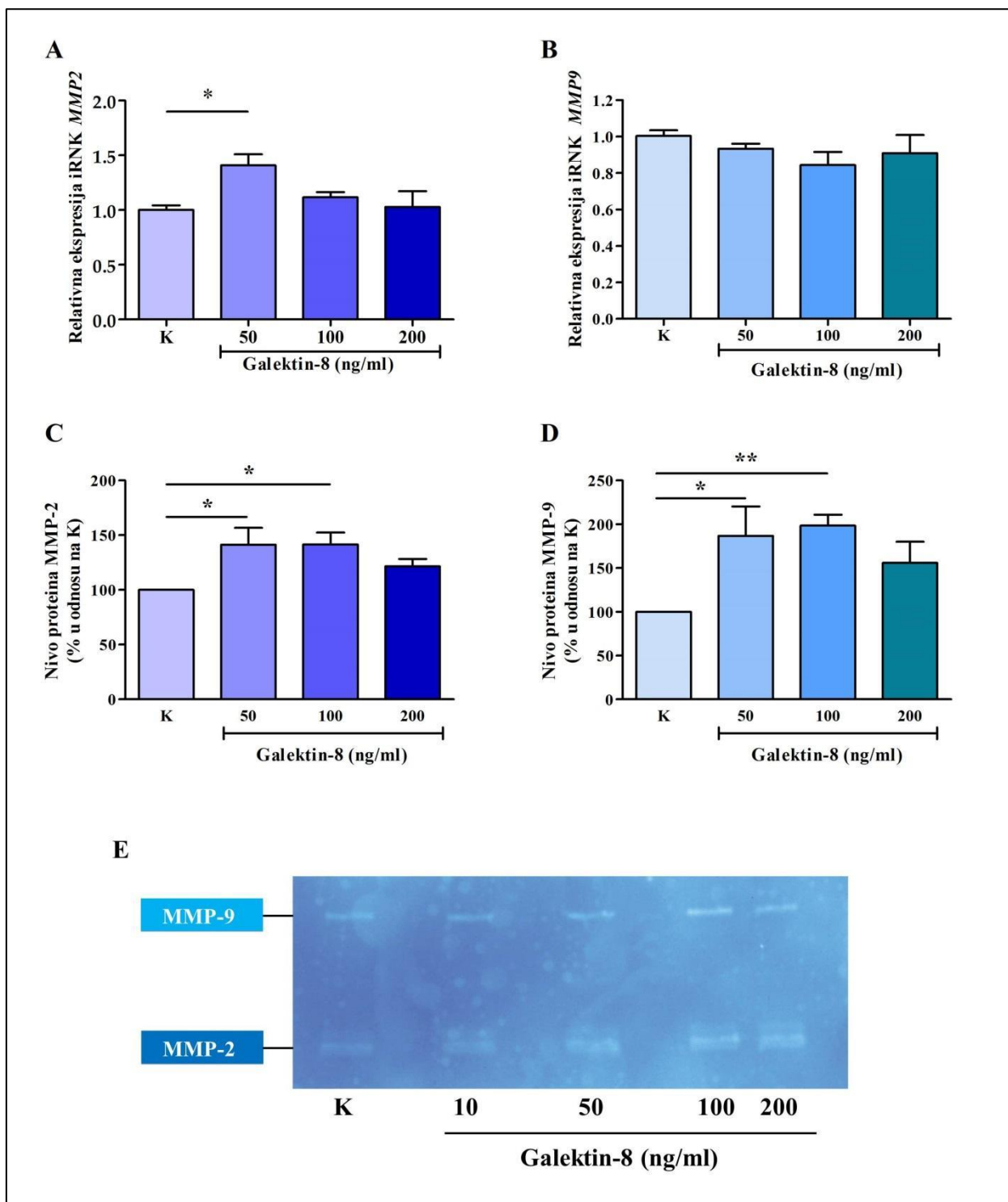
procenat u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu (K) i prikazani su kao srednja vrednost + SEM. Eksperimenti su sprovedeni četiri puta, sa najmanje četiri tehnička replikata.

4.1.6 Uticaj rh galektina-8 na gensku ekspresiju i nivo MMP-2 i MMP-9

Kako bi se dalje ispitaio potencijalni mehanizam kojim galektin-8 stimuliše trofoblastnu ćelijsku invaziju, analiziran je efekat rh galektina-8 na ekspresiju MMP-2 i MMP-9 na nivou iRNK i na proteinskom nivou.

Kao što je prikazano na **Slici 14A**, tretman HTR-8/SVneo ćelija rh galektinom-8 u koncentraciji od 50 ng/ml doveo je do statistički značajnog povećanja ekspresije iRNK za MMP-2, sa porastom od 1.408 puta u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu, K ($p < 0,05$). Nasuprot tome, ekspresija iRNK za MMP-9 nije pokazala značajne promene pri tretmanu testiranim koncentracijama galektina-8 (**Slika 14B**). Srednje vrednosti stepena promene u odnosu na K za *MMP2* ekspresiju \pm SEM za K, 50, 100 i 200 ng/ml redno su: $1,00 \pm 0,04$; $1,41 \pm 0,10$; $1,12 \pm 0,05$; $1,03 \pm 0,15$; dok su za *MMP9*: $1,00 \pm 0,03$; $0,93 \pm 0,03$; $0,84 \pm 0,07$; $0,91 \pm 0,10$.

Nivo proteolitičke aktivnosti MMP-2 i MMP-9 u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija, ključnih enzima uključenih u degradaciju ECM i regulaciju invazivnosti trofoblastnih ćelija, analizirani su pomoću želatinske SDS-PAGE zimografije. Na nivou proteina, tretman rh galektinom-8 je doveo do povećanja nivoa MMP-2, pri čemu su koncentracije od 50 ng/ml i 100 ng/ml dovele do porasta na 141,2% i 141,6% vrednosti u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu (K), redom ($p < 0,05$ za obe vrednosti; **Slika 14C** i **14E**). Takođe, pri tretmanu istim koncentracijama rh galektinom-8, zabeleženo je značajno povećanje aktivnosti MMP-9, sa vrednostima od 186,8% ($p < 0,05$) i 198,5% ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolnu grupu (K). (**Slika 14D** i **14E**). Srednje vrednosti nivoa degradovanih proteina od strane MMP-2 \pm SEM za K, 50, 100 i 200 ng/ml redom su: $100\% \pm 0,0$; $141,2 \pm 15,5$; $141,6 \pm 10,8$; $121,5 \pm 6,8$; dok je za MMP-9: $100,0 \pm 0,0$; $186,8 \pm 33,5$; $198,5 \pm 12,4$; $155,9 \pm 24,1$.



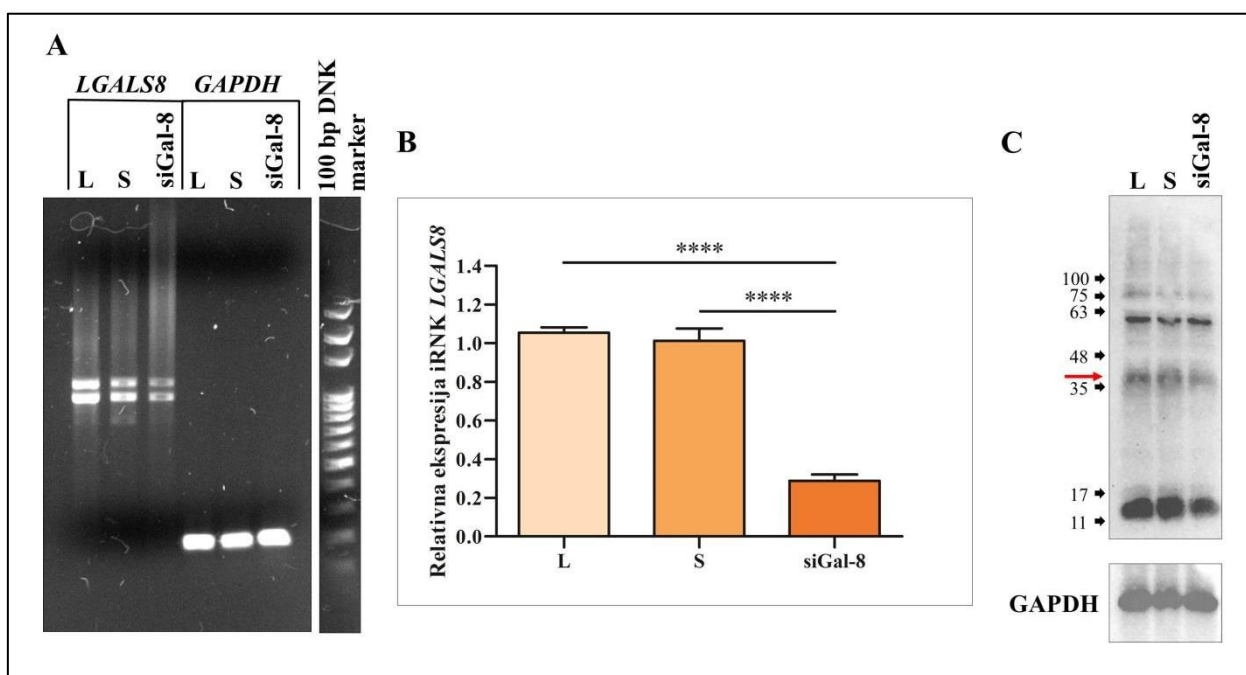
Slika 14. Efekat rh galektina-8 na gensku ekspresiju i proteolitičku aktivnost MMP-2 i MMP-9. Relativna ekspresija iRNK za MMP-2 (A) i MMP-9 (B) analizirana je u HTR-8/SVneo ćelijama qPCR tehnikom nakon tretmana rh galektinom-8. Eksperimenti su sprovedeni tri puta u duplikatu, i predstavljani kao srednja vrednost $2^{\Delta\Delta C_t}$ + SEM. Dodatno, efekat rh galektina-8 na nivo proteolitičke aktivnosti MMP-2 (C) i MMP-9 (D) ispitivan je u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija želatinskom zimografijom. Reprezentativni zimogram je prikazan na panelu E. Rezultati su izraženi kao procenat u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu (K) i prikazani su kao srednja vrednost + SEM. Eksperimenti su sprovedeni najmanje tri puta, sa najmanje dva tehnička replikata po eksperimentu. Statistički značajni rezultati označeni su kao * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$.

4.2 Ispitivanje efekata utišavanja ekspresije *LGALS8* gena na HTR-8/SVneo ćelijsku liniju

Kako bi se ispitaio doprinos endogenog trofoblastnog galektina-8 funkcionalnim svojstvima trofoblastnih ćelija, primenjen je pristup utišavanja ekspresije njegovog *LGALS8* gena u ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo, pomoću specifičnih siRNA. Cilj je bio da se ispita kako smanjena ekspresija ovog lektina utiče na ključna funkcionalna svojstva ovih ćelija, uključujući adheziju, migraciju, invaziju i ekspresiju integrina i MMP.

4.2.1 Efikasnost utišavanja ekspresije *LGALS8* gena na HTR-8/SVneo ćelijisku liniju

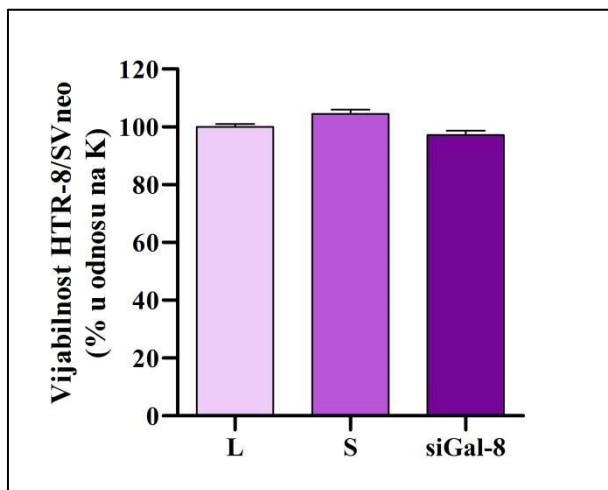
Pre ispitivanja uticaja utišavanja *LGALS8* gena na funkcionalna svojstva trofoblasta, bilo je neophodno potvrditi efikasnost utišavanja ekspresije *LGALS8* gena pomoću specifične siRNA u HTR-8/SVneo ćelijama. Kao što je prikazano na **slici 15**, nakon sprovedene RT-PCR procedure zasnovane na reverznoj transkripciji, izvršene su PCR analize na agaroznom gelu (**Slika 15A**), qPCR (**Slika 15B**) i Western blot analiza (**Slika 15C**). Utvrđeno je da transfekcija ovih ćelija specifičnim siRNA (siGal-8), značajno smanjuje relativnu ekspresiju galektina-8 na iRNK i proteinskom nivou 72 sata nakon transfekcije, u poređenju sa kontrolnim grupama tretiranim samo lipofektaminom (L) ili negativnom kontrolnom siRNA (S). Rezultati qPCR analize su pokazali da je ekspresija *LGALS8* značajno smanjena nakon tretmana (relativna ekspresija u odnosu na kontrolnu grupu L: 0,29, $p < 0,0001$, **Slika 15B**). Srednje vrednosti relativne ekspresije za iRNK *LGALS8* ekspresiju \pm SEM za L, S, i siGal-8 redom su: $1,00 \pm 0,03$; $1,01 \pm 0,06$; $0,29 \pm 0,03$. Smanjenje ekspresije galektina-8 na nivou iRNK (**Slika 15A**) potvrđeno je i nižim nivoom ekspresije proteina (**Slika 15C**).



Slika 15. Analiza efikasnosti utišavanja *LGALS8* gena. (A) PCR, (B) qPCR, (C) Western Blot. Rezultati qPCR analize (B) su prikazani kao $2^{\Delta\Delta Ct} + SEM$. Eksperimenti su sprovedeni najmanje tri puta sa po dva tehnička replikata po eksperimentu. L – negativna kontrolna grupa (Lipofectamine RNAiMAX), S – kontrola tretirana negativnom kontrolnom siRNA, siGal-8 – HTR-8/SVneo ćelije tretirane specifičnom siRNA za *LGALS8*. Crvena strelica označava galektin-8 na očekivanom mestu na Western blot membrani. Statistički značajni rezultati označeni su kao **** $p < 0,0001$.

4.2.2 Procena vijabilnosti HTR-8/SVneo ćelija nakon utišavanja ekspresije *LGALS8* korišćenjem MTT testa

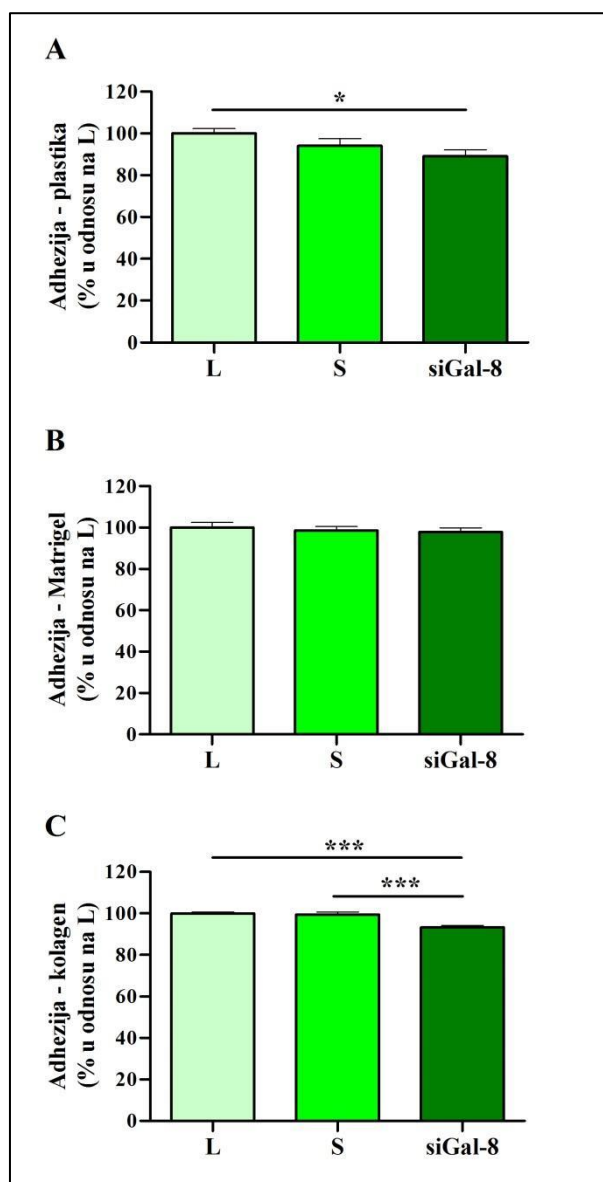
Analiza vijabilnosti HTR-8/SVneo ćelija sa utišanom ekspresijom *LGALS8*, ispitana pomoću MTT testa, nije pokazala statistički značajne razlike u poređenju sa obe kontrolne grupe ćelija (Slika 16). Srednje vrednosti ćelijske vijabilnosti \pm SEM za L, S i siGal-8 redom su: $100\% \pm 0,9$; $105,2\% \pm 1,6$; $97,3\% \pm 1,5$.



Slika 16. Efekat utišavanja *LGALS8* na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija. Rezultati su izraženi kao procenat u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu (L) i prikazani su kao srednja vrednost + SEM. Eksperimenti su ponovljeni tri puta, sa po najmanje četiri tehnička replikata. L – negativna kontrolna grupa (Lipofectamine RNAiMAX), S – kontrola tretirana negativnom kontrolnom siRNA, siGal-8 – HTR-8/SVneo ćelije tretirane specifičnom siRNA za *LGALS8*.

4.2.3 Efekat utišavanja ekspresije *LGALS8* na sposobnost adhezije HTR-8/SVneo ćelijsku liniju

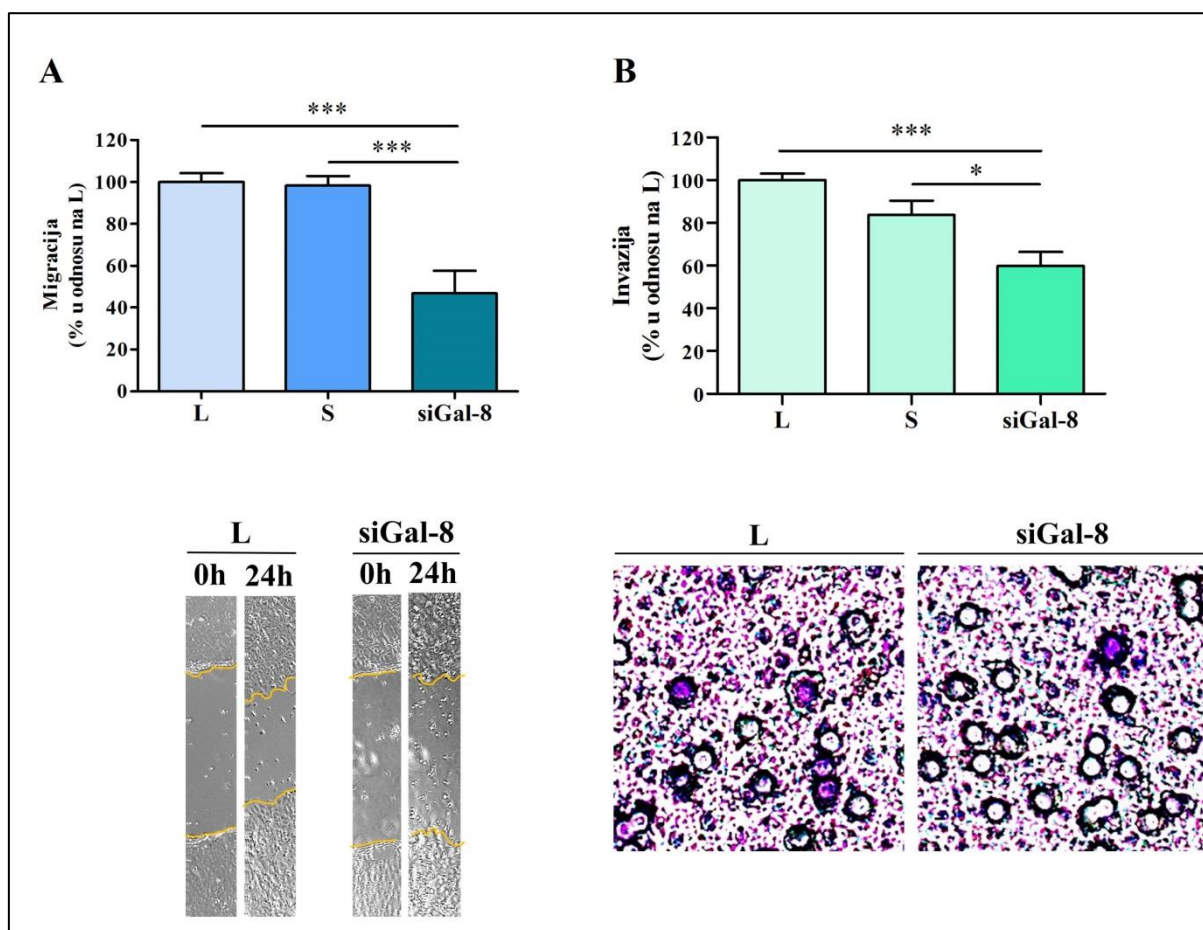
Nakon utišavanja ekspresije *LGALS8*, ispitana je adhezija HTR-8/SVneo ćelija na plastiku, Matrigel i kolagen tipa I (Slika 17). Značajno smanjenje adhezije zabeleženo je na plastičnoj površini u poređenju sa kontrolom grupom L ($89,03\%$, $p < 0,05$). Sličan efekat primećen je i u slučaju adhezije na kolagen, gde je adhezija iznosila $93,3\%$ u odnosu na obe kontrolne grupe koje su imale međusobno istu vrednost ($p < 0,001$ u odnosu na L i S kontrolne grupe). Nasuprot tome, nije uočena značajna promena u adheziji u poređenju sa kontrolnim grupama za Matrigel. Srednje vrednosti adhezije na plastiku \pm SEM za L, S i siGal-8 redom su: $100\% \pm 2,3$; $94,0\% \pm 3,4$; $89,0\% \pm 3,1$; za kolagen: $100\% \pm 0,8$, $99,4\% \pm 1,3$; $93,3\% \pm 0,9$; za Matrigel: $100,0 \pm 2,4$; $98,7 \pm 1,9$; $97,8 \pm 2,0$.



Slika 17. Efekat utišavanja ekspresije *LGALS8* na adheziju ćelija na različitim površinama: plastika (A), Matrigel (B) i kolagen tipa I (C). Rezultati su izraženi u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu (L) i prikazani kao srednja vrednost + SEM. Eksperimenti su sprovedeni najmanje dva puta, sa po šest tehničkih replikata. L – negativna kontrolna grupa (Lipofectamine RNAiMAX), S – kontrola tretirana negativnom kontrolnom siRNA, siGal-8 – HTR-8/SVneo ćelije tretirane specifičnom siRNA za *LGALS8*. Statistički značajni rezultati označeni su kao *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

4.2.4 Analiza migracionog i invazivnog potencijala na HTR-8/SVneo ćelijsku liniju nakon utišavanja ekspresije *LGALS8*

Uticaj utišavanja ekspresije *LGALS8* dalje je ispitan na migratorna i invazivna svojstva HTR-8/SVneo ćelija. Migracija ćelija bila je značajno smanjena na 46,89% u poređenju sa L kontrolnom grupom (100%, L vs siGal-8, $p < 0,001$), kao i u poređenju sa S kontrolnom grupom (98,29%, S vs siGal-8, $p < 0,001$) što je prikazano na **slici 18A**. Invazivnost ćelija tretiranih siGal-8 bila je značajno smanjena na 59,82% u odnosu na kontrolnu grupu L (100%, L vs siGal-8, $p < 0,001$), kao i u odnosu na kontrolnu grupu S (83,72%, S vs siGal-8, $p < 0,05$), što je prikazano na **slici 18B**. Srednje vrednosti testa migracije \pm SEM za L, S i siGal-8 redom su: 100,0% \pm 4,2; 98,3 \pm 4,5, 46,9 \pm 10,7; dok su za test invazije: 100,0% \pm 3,0; 83,7% \pm 6,6; 59,8% \pm 6,5.



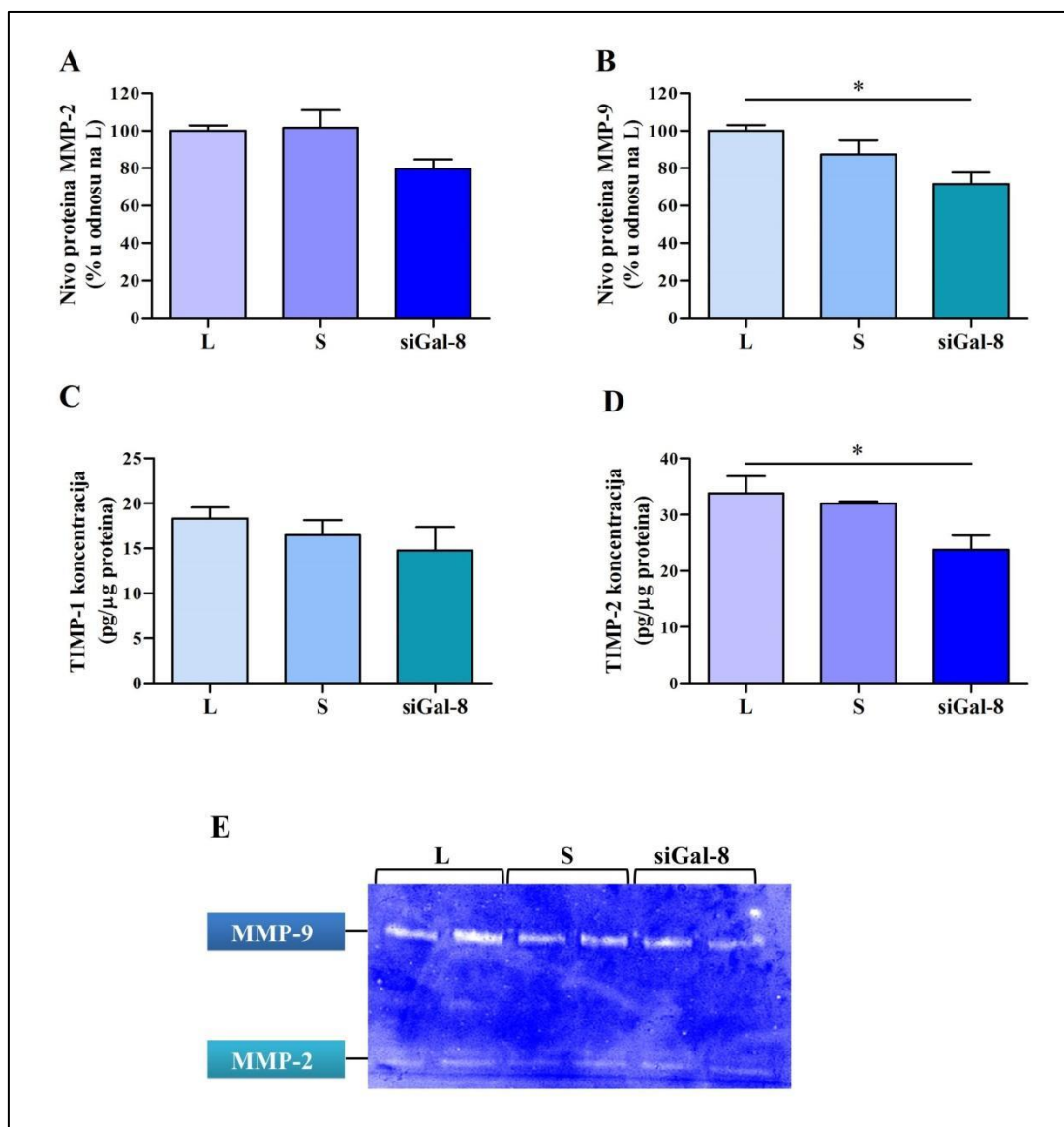
Slika 18. Efekat utišavanja ekspresije *LGALS8* na migraciju (A) i invaziju HTR-8/SVneo ćelija (B). Rezultati su izraženi kao procenti u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu (L) i prikazani kao srednja vrednost + SEM. Eksperimenti su sprovedeni najmanje tri puta sa dva tehnička replikata po eksperimentu. L – negativna kontrolna grupa (Lipofectamine RNAiMAX), S – kontrola tretirana negativnom kontrolnom siRNA, siGal-8 – HTR-8/SVneo ćelije tretirane specifičnom siRNA za *LGALS8*. Statistički značajni rezultati označeni su kao *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

4.2.5 Efekat utišavanja *LGALS8* na proteolitičku aktivnost matriksnih metaloproteinaza i na ekspresiju tkivnih inhibitora metaloproteinaza u HTR-8/SVneo ćelijsku liniju

U cilju razjašnjavanja mehanizma kojim trofoblastni galektin-8 reguliše invazivni potencijal trofoblastnih ćelija, analiziran je efekat utišavanja ekspresije *LGALS8* na nivo MMP-2 i MMP-9 proteina u kondicioniranim medijumima. Na nivou proteina, ćelije sa utišanom ekspresijom *LGALS8* pokazale su trend smanjenja nivoa MMP-2 (79,66%) u poređenju sa kontrolnom grupom L, ali razlika nije bila statistički značajna (**Slika 19A**). Za MMP-9, nivo proteina je bio statistički značajno smanjen na 71,60% u odnosu na kontrolnu grupu L ($p < 0,05$), dok je u kontrolnoj grupi S iznosio 87,35% (**Slika 19B**). Srednje vrednosti rezultata određivanja nivoa MMP-2 \pm SEM za L, S i siGal-8 redom su: 100,0% \pm 2,9; 101,6 \pm 9,4; 79,7% \pm 5,0; dok su za MMP-9: 100,0% \pm 3,1; 87,4 \pm 7,5; 71,6 \pm 6,1.

Pored analize aktivnosti MMP enzima, ispitivani su i nivoi njihovih endogenih inhibitora, TIMP-1 i TIMP-2, kako bi se procenio potencijalni regulatorni efekat utišavanja *LGALS8* gena na ravnotežu između proteolitičke aktivnosti i inhibicije ekspresije MMP. Prosečna koncentracija TIMP-1 u HTR-8/SVneo ćelijama sa utišanom ekspresijom *LGALS8* iznosila je 14,78 pg/ μ g proteina, u poređenju sa 18,32 pg/ μ g u kontrolnoj grupi L i 16,47 pg/ μ g u kontrolnoj grupi S, pri čemu razlike nisu bile statistički značajne (**Slika 19C**). Nasuprot tome, kod TIMP-2 zabeleženo je

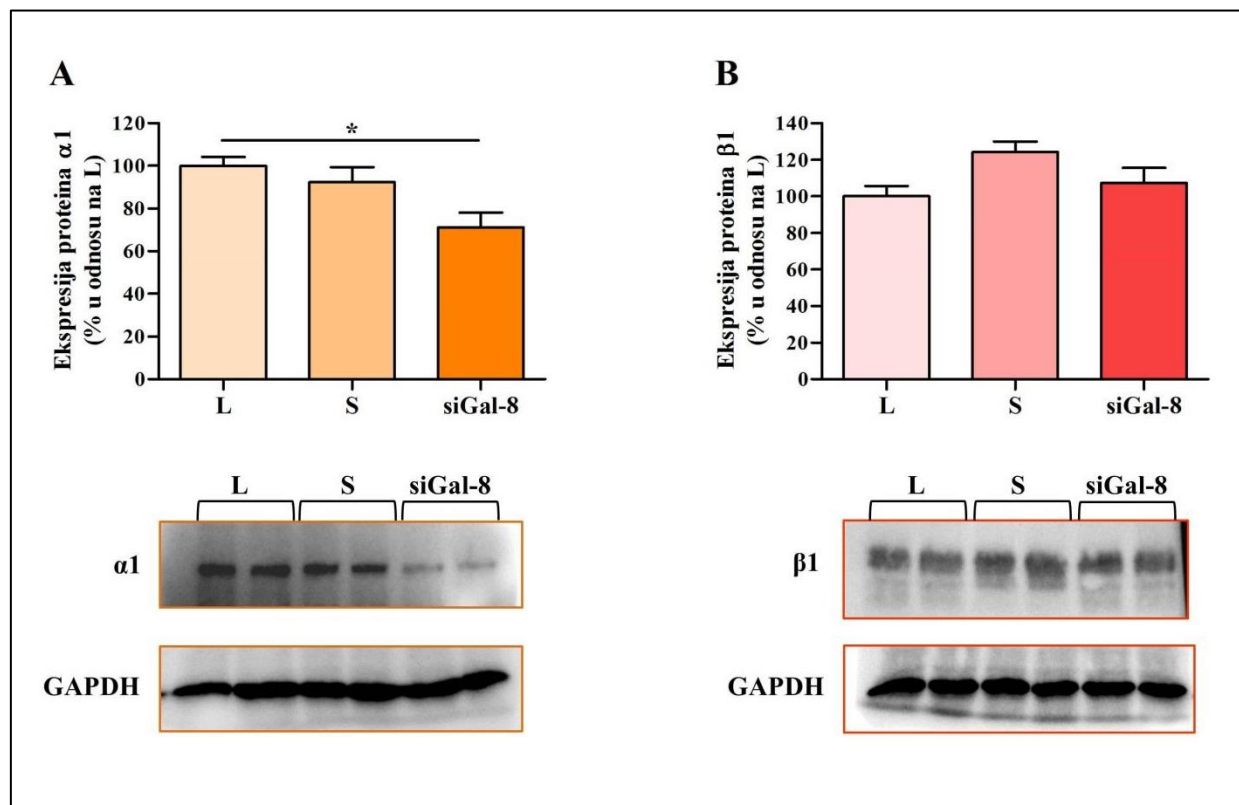
značajno smanjenje koncentracije u ćelijama sa utišanim *LGALS8* (23,77 pg/μg proteina) u odnosu na kontrolnu grupu L (33,82 pg/μg proteina; $p < 0,05$), dok je u S kontrolnoj grupi iznosila 31,97 pg/μg proteina (**Slika 19D**). Srednje vrednosti TIMP-1 ± SEM za L, S i siGal-8 redom su: 18,3 pg/μg ± 1,2; 16,5 pg/μg ± 1,7, 14,8 pg/μg ± 2,6; dok su za TIMP-2: 33,8 pg/μg ± 3,0; 32,0 pg/μg ± 0,4; 23,8 pg/μg ± 2,5.



Slika 19. Efekat utišavanja ekspresije *LGALS8* na nivo proteina MMP-2 i -9 i TIMP-1 i -2. Efekat utišavanja ekspresije *LGALS8* na nivo proteina MMP-2 (A) i MMP-9 (B). Rezultati su izraženi kao procenat u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu (L) i prikazani su kao srednja vrednost + SEM. Efekat utišavanja ekspresije *LGALS8* na nivo proteina TIMP-1 (C) i TIMP-2 (D) prikazanih u pg/μg proteina. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + SEM. (E) Reprezentativni zimogram proteolitičke aktivnosti MMP-2 i MMP-9. Eksperimenti su sprovedeni najmanje tri puta sa po dva tehnička ponavljanja po eksperimentu. L – negativna kontrolna grupa (Lipofectamine RNAiMAX), S – kontrola tretirana negativnom kontrolnom siRNA, siGal-8 – HTR-8/SVneo ćelije tretirane specifičnom siRNA za *LGALS8*. Statistički značajni rezultati označeni su * $p < 0,05$.

4.2.6 Efekat utišavanja *LGALS8* na ekspresiju integrina $\alpha 1$ i $\beta 1$ u HTR-8/SVneo ćelijsku liniju

Efekat utišavanja *LGALS8* gena putem siRNK analiziran je kako bi se utvrdio njegov uticaj na ekspresiju integrina $\alpha 1$ i $\beta 1$ na proteinskom nivou. U ćelijama sa utišanom ekspresijom *LGALS8* došlo je do smanjenja ekspresije integrina $\alpha 1$ na 71,18% u poređenju sa L, $p < 0,05$ (Slika 20A). Za integrin $\beta 1$, ekspresija proteina iznosila je 107,3% u odnosu na L, bez statistički značajne razlike (Slika 20B). Srednje vrednosti ekspresije integrina $\alpha 1 \pm$ SEM za L, S i siGal-8 redno su: $100,0\% \pm 4,2$; $92,3 \pm 7,1$; $71,2 \pm 6,8$; dok su za integrin $\beta 1$: $100,0\% \pm 5,6$; $124,2 \pm 5,7$; $107,3 \pm 8,2$.



Slika 20. Efekat utišavanja *LGALS8* gena putem siRNK na ekspresiju integrina $\alpha 1$ i $\beta 1$ u HTR-8/SVneo ćelijama. (A) i (B) prikazuju ekspresiju proteina integrinskih subjedinica $\alpha 1$ i $\beta 1$ u ćelijama HTR-8/SVneo, ispitivan primenom Western blot analize. Rezultati su izraženi kao procenat u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu (L) i prikazani su kao srednja vrednost + SEM na osnovu denzitometrijske analize. Ispod grafikona su prikazane reprezentativne slike membrane. L – negativna kontrolna grupa (Lipofectamine RNAiMAX), S – kontrola tretirana negativnom kontrolnom siRNA, siGal-8 – HTR-8/SVneo ćelije tretirane specifičnom siRNA za *LGALS8*. Statistički značajni rezultati označeni su * $p < 0,05$.

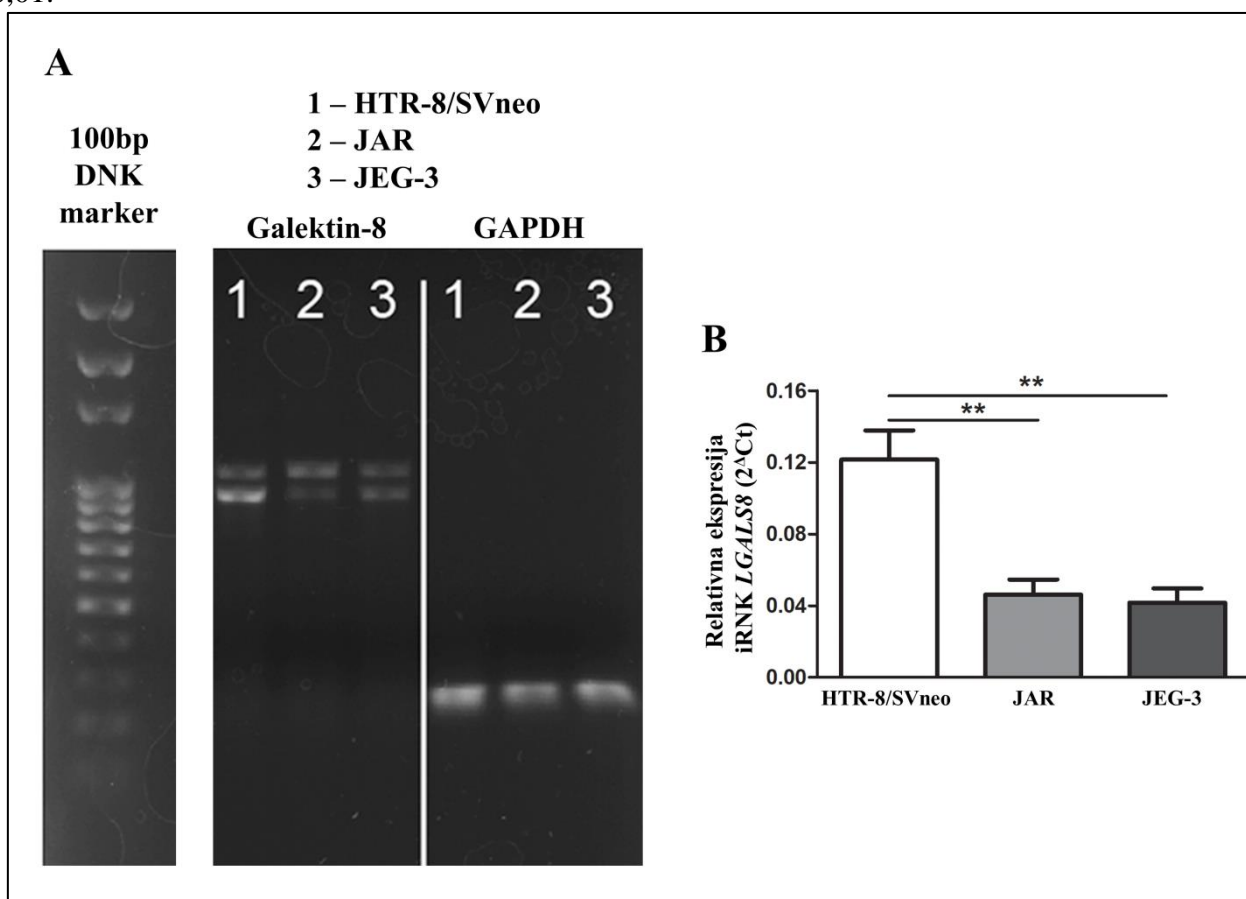
4.3 Određivanje ekspresije galektina-8 u normalnim i maligno transformisanim (horiokarcinomskim) trofoblastnim ćelijama

U ovom istraživanju, u svrhu uloge galektina-8 u razvoju trofoblastnih tumora i širenju metastaza, analizirali smo profile ovog lektina u normalnim ekstravilusnim trofoblastnim ćelijama i ćelijskim linijama horiokarcinoma, pri istim eksperimentalnim uslovima radi direktnog poređenja. Ekspresija galektina-8 na nivou iRNK i proteina analizirana je u trofoblastnim ćelijskim linijama — normalnim ekstravilusnim HTR-8/SVneo ćelijama i horiokarcinomskim JAR i JEG-3 ćelijama humanog porekla.

4.3.1 Ekspresija *LGALS8* gena u normalnim ekstravilusnim trofoblastnim ćelijama i ćelijama horiokarcinoma

U okviru primenjenih eksperimentalnih uslova, sve ispitivane trofoblastne ćelije dosledno su ekspimirale gen *LGALS8* (Slika 21). Međutim, trofoblastne ćelijske linije pokazale su razlike u relativnoj ekspresiji galektina-8. PCR analizom identifikovani su transkripti dužine 957 bp i 1083 bp u svim analiziranim ćelijskim linijama. Na osnovu predikcije PCR produkata putem Primer-BLAST alata, transkripti od 957 bp odgovaraju varijantama 2 i 3, dok transkripti od 1083 bp odgovaraju varijantama 1 i 4 gena *LGALS8*. Ipak, primenjenom metodologijom nije bilo moguće sa sigurnošću utvrditi da li je za svaku dužinu prisutan jedan ili oba transkripta. Zanimljivo je da su u HTR-8/SVneo ćelijama transkripti od 957 bp bili izraženiji, dok su u horiokarcinomskim ćelijskim linijama JAR i JEG-3 dominirali transkripti od 1083 bp (Slika 21A).

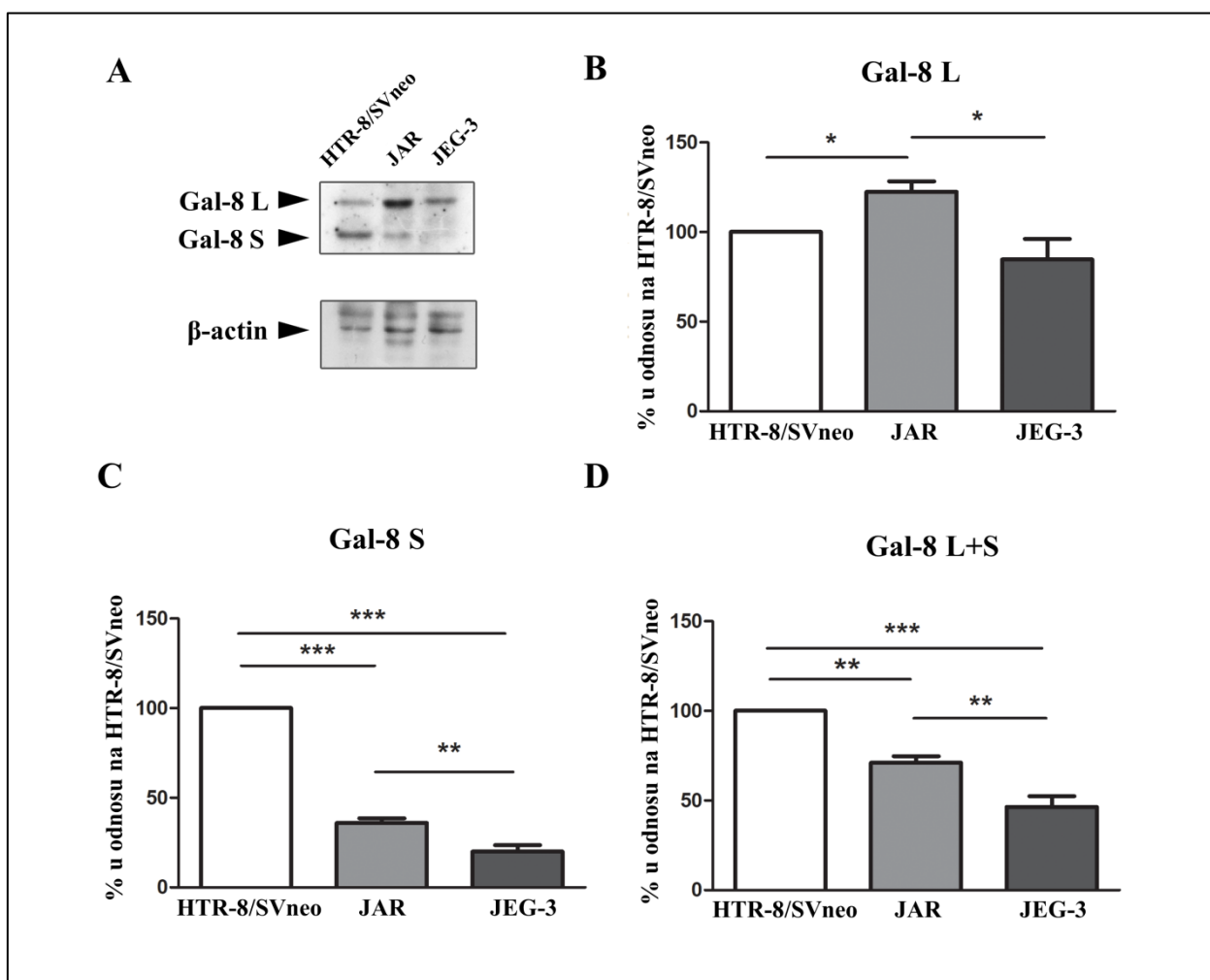
Rezultati dobijeni qPCR analizom potvrdili su da HTR-8/SVneo ćelije sadrže viši nivo *LGALS8* u poređenju sa horiokarcinomskim ćelijskim linijama. Relativna ekspresija iRNK za galektin-8 bila je značajno viša u HTR-8/SVneo ćelijama (vrednost za $2^{-\Delta Ct}$ 0,12) u odnosu na JAR (vrednost za $2^{-\Delta Ct}$ 0,05; $p < 0,01$) i JEG-3 ćelije (vrednost za $2^{-\Delta Ct}$ 0,04; $p < 0,01$), što je prikazano na slici 21B. Srednje vrednosti za HTR-8/SVneo – $0,12 \pm 0,01$; JAR – $0,05 \pm 0,01$; JEG-3 – $0,04 \pm 0,01$.



Slika 21. (A) Profil ekspresije *LGALS8* gena u ćelijskim linijama HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3. Analiza ekspresije je urađena RT-PCR i PCR metodom. **(B) Relativni nivo ekspresije *LGALS8* gena u ćelijskim linijama HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3.** Analiza je urađena primenom qPCR metode. Podaci su prikazani kao srednja vrednost + SEM na osnovu tri nezavisna eksperimenta urađena u duplikatu. Statistička značajnost označena je kao $**p < 0,01$.

4.3.2 Ekspresija galektina-8 na proteinskom nivou u HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3 ćelijskim linijama

Ekspresija galektina-8 na nivou proteina ispitivana je pomoću Western blot analize (**Slika 22**). U lizatima ćelija HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3 detektovane su dve proteinske trake koje odgovaraju galektinu-8 sa molekulskim masama od približno 34 kDa (Gal-8S) i 40 kDa (Gal-8L) (**Slika 22A**). U skladu sa rezultatima PCR analize, značajno viši nivo izoforme od ~34 kDa zabeležen je u HTR-8/SVneo ćelijama ($100,0\% \pm 0,02$), dok su u JAR i JEG-3 ćelijama ti nivoi iznosili $35,9\% \pm 2,7$ i $19,9\% \pm 8,3$ redno u odnosu na nivo u HTR-8/SVneo ćelijama (HTR-8/SVneo vs. JAR, $p < 0,001$; HTR-8/SVneo vs. JEG-3, $p < 0,001$; JAR vs. JEG-3, $p < 0,01$; **Slika 22C**). Izoforma Gal-8L bila je značajno izraženija u JAR ćelijama ($122,5\% \pm 5,9$, $p < 0,05$; **Slika 22B**) u poređenju sa HTR-8/SVneo ($100,0\% \pm 0,0002$) i JEG-3 ćelijama ($85,0\% \pm 11,4$; $p < 0,05$; **Slika 22B**). Međutim, ukupni nivoi galektina-8 proteina bili su značajno niži u JAR i JEG-3 ćelijama u poređenju sa HTR-8/SVneo ćelijama ($100,0\% \pm 0,0$; $71,0\% \pm 3,6$; $p < 0,01$ i $46,4\% \pm 6,0$; $p < 0,001$ redom; **Slika 22D**) što je u skladu sa rezultatima qPCR analize. U pojedinim eksperimentima uočena je i dodatna proteinska traka od približno ~50 kDa u analiziranim ćelijskim lizatima (nije prikazano). Ukupno posmatrano, podaci ukazuju na nižu ekspresiju galektina-8 u horiokarcinomskim ćelijama JAR i JEG-3 u poređenju sa normalnim ekstravilusnim trofoblastnim HTR-8/SVneo ćelijama.

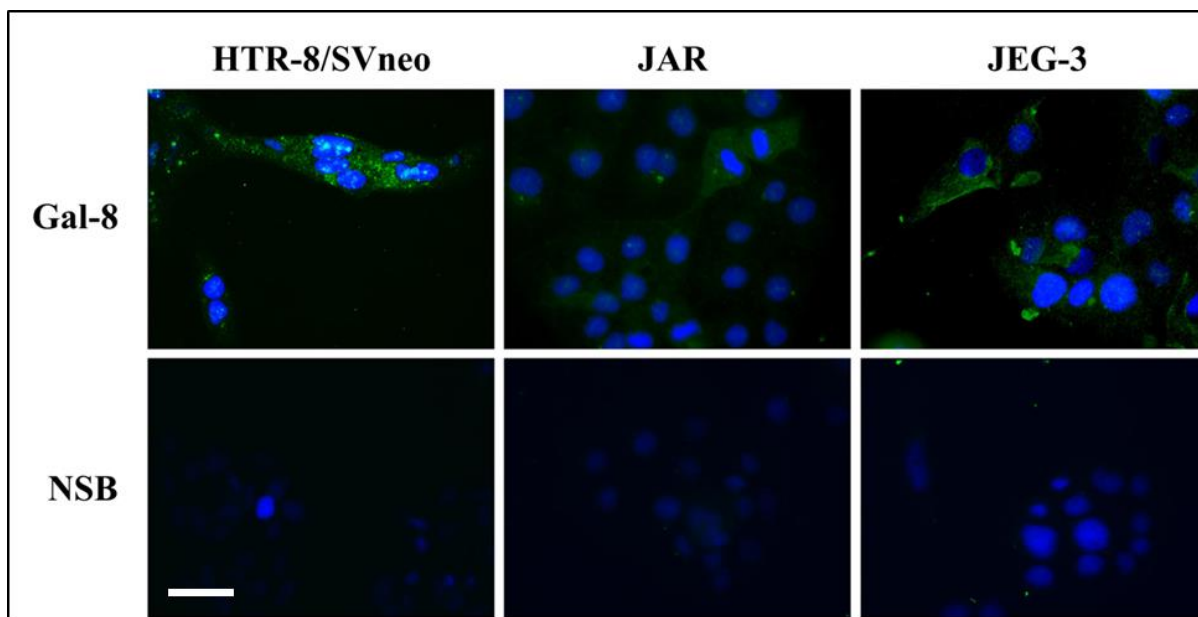


Slika 22. Ekspresija galektina-8 proteina u HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3 ćelijama. Prikazana je reprezentativna slika membrane nakon Western blot metode (A). Relativni nivo ekspresije galektina-8

uključujući njegove izoforme Gal-8 L (B) i Gal-8 S (C), kao i njihovu kombinaciju (D), prikazan je u poređenju sa HTR-8/SVneo ćelijama, na osnovu denzitometrijske analize. Ekspresija β -aktina je korišćena za normalizaciju količine nanetog uzorka. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + SEM na osnovu četiri urađena eksperimenta. Statistička značajnost označena je kao: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.3 Imunolokalizacija galektina-8 u HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3 ćelijskim linijama

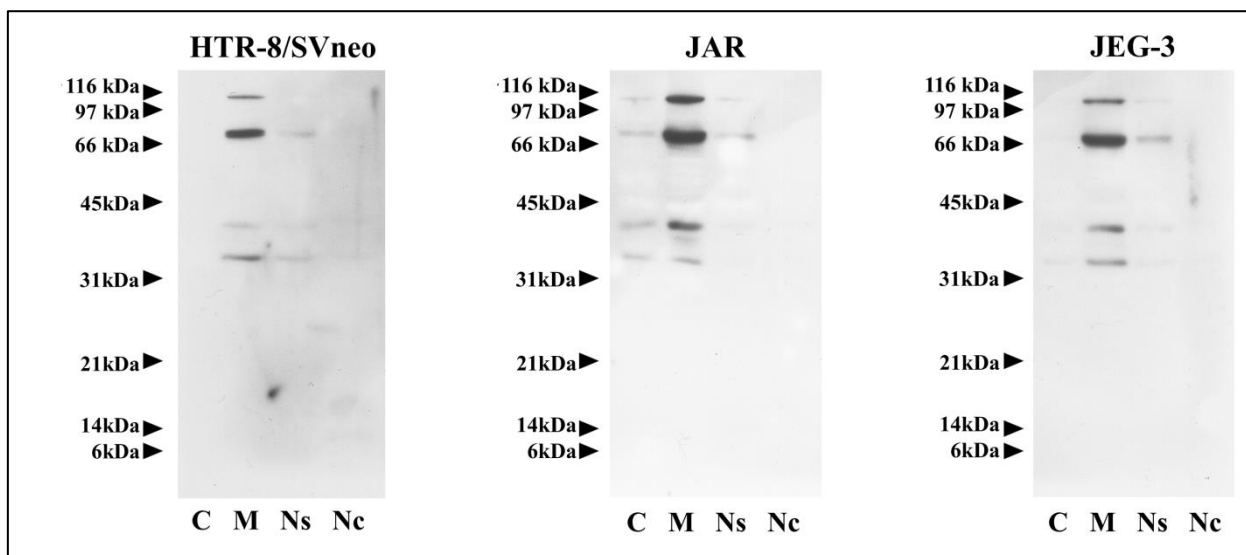
Imunocitohemijska analiza ekspresije galektina-8 u ispitivanim trofoblastnim ćelijskim linijama ukazala je na prisustvo varijabilnosti u obrascima imunopozitivnosti i njihovom intenzitetu (Slika 23). Kod HTR-8/SVneo ćelija se uočava granularna imunopozitivnost u citoplazmi i nukleusu, kod JAR ćelija uniformna imunopozitivnost u citoplazmi, dok se kod JEG-3 ćelija pored citoplazmatskog uočava i membransko bojenje.



Slika 23. Imunolokalizacija galektina-8 u ćelijskim linijama HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3. Prikazane su reprezentativne slike imunofluorescentnog bojenja koje pokazuju prisustvo galektina-8 (zeleni signal), kao i kontrola nespecifičnog vezivanja (NSB). Jezra su obojena DAPI bojom. Merna skala 10 μ m.

4.3.4 Subcelularna ekspresija galektina-8 u HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3 ćelijskim linijama

Analizom ćelijskih frakcija na prisustvo galektina-8, uočeno je prisustvo proteinske trake molekulske mase ~ 34 kDa u membranskoj frakciji (M) svih ispitivanih ćelijskih linija (Slika 24). Pored dominantne proteinske trake, uočene su i dodatne trake u rasponu od ~ 40 kDa do ~ 100 kDa. U solubilnoj nukleusnoj frakciji (Ns) svih linija detektovane su proteinske trake slabijeg intenziteta u istom rasponu molekulskih masa. Takođe, u citoplazmatskim frakcijama (C) JAR i JEG ćelija registrovane su slabo imunoreaktivne trake galektina-8 mase ~ 34 kDa, kao i one između 40 kDa i 100 kDa (Slika 24). U hromatinskoj frakciji nukleusa (Nc) nije bilo uočljive imunoreaktivnosti.



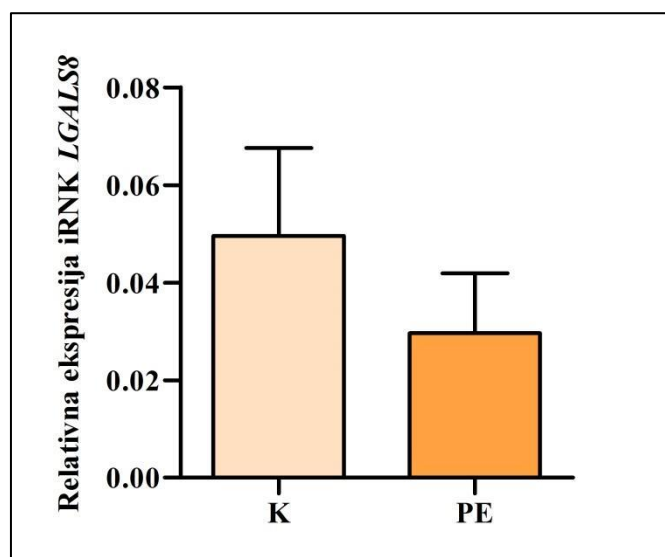
Slika 24. Subcelularna ekspresija galektina-8 u HTR-8/SVneo, JAR i JEG-3 ćelijama. Subcelularne frakcije dobijene iz trofoblastnih ćelijskih linija analizirane su Western blot metodom. Oznake korišćene za frakcije su: C – citoplazmatska, M – membranska, Ns – solubilna nukleusna, Nc – hromatinska nukleusna. Označene su molekulske mase korišćenih proteinskih standarda.

4.4 Ekspresija galektina-8 u tkivu placenti nakon normalne trudnoće i trudnoće komplikovanih preeklampsijom

Radi ispitivanja potencijalne uloge galektina-8 u patofiziologiji preeklampsije analizirana je njegova ekspresija na nivou gena i proteina, kao i imunolokalizacija u placentarnom tkivu nakon normalne trudnoće i trudnoće komplikovane preeklampsijom.

4.4.1 Ekspresija *LGALS8* gena u tkivu placenti nakon normalne trudnoće i trudnoće komplikovanih preeklampsijom

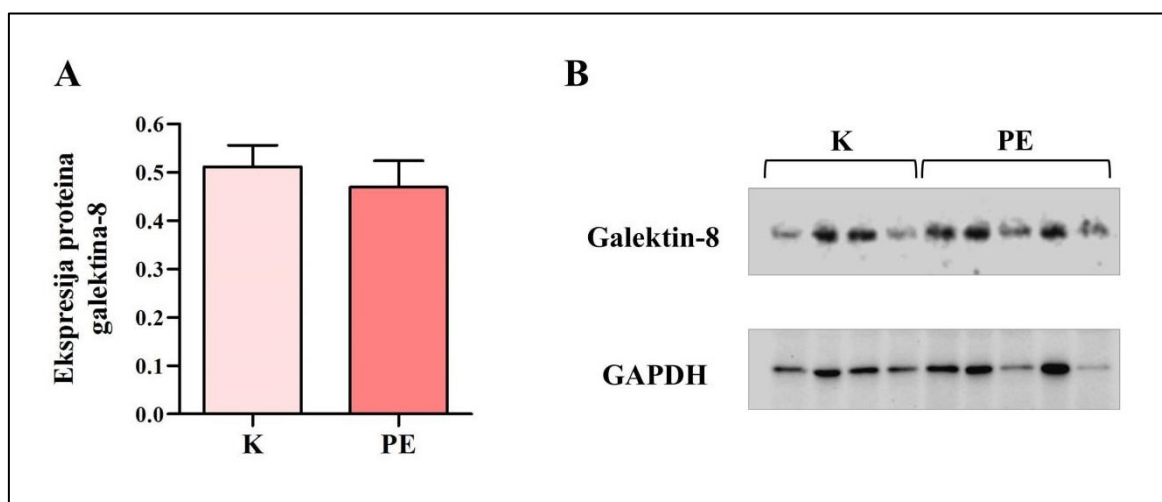
U sprovedenoj analizi ekspresije gena *LGALS8* qPCR metodom nije utvrđena statistički značajna razlika u nivou ekspresije iRNK za galektin-8 između zdravih trudnoća i trudnoća komplikovanih preeklampsijom. Ipak, uočen je trend smanjenja srednjih vrednosti ekspresije: u kontrolnoj grupi srednja vrednost $2^{-\Delta Ct}$ je iznosila 0,0495 (\pm 0,018), dok je kod grupe sa preeklampsijom ona bila niža i iznosila 0,0297 (\pm SEM: 0,012). Međutim, zbog velikih varijacija između pojedinačnih uzoraka, nije dosegnut nivo statističke značajnosti (**Slika 25**).



Slika 25. Ekspresija *LGALS8* gena u tkivu placenti nakon zdravih trudnoća i trudnoća komplikovanih preeklampsijom. Rezultati su prikazani kao vrednost $2^{-\Delta Ct} + SEM$. K - kontrolna zdrava grupa (n = 8), PE - grupa sa preeklampsijom (n = 10).

4.4.2 Nivo galektina-8 u tkivu placenti nakon normalne trudnoće i trudnoće sa preeklampsijom

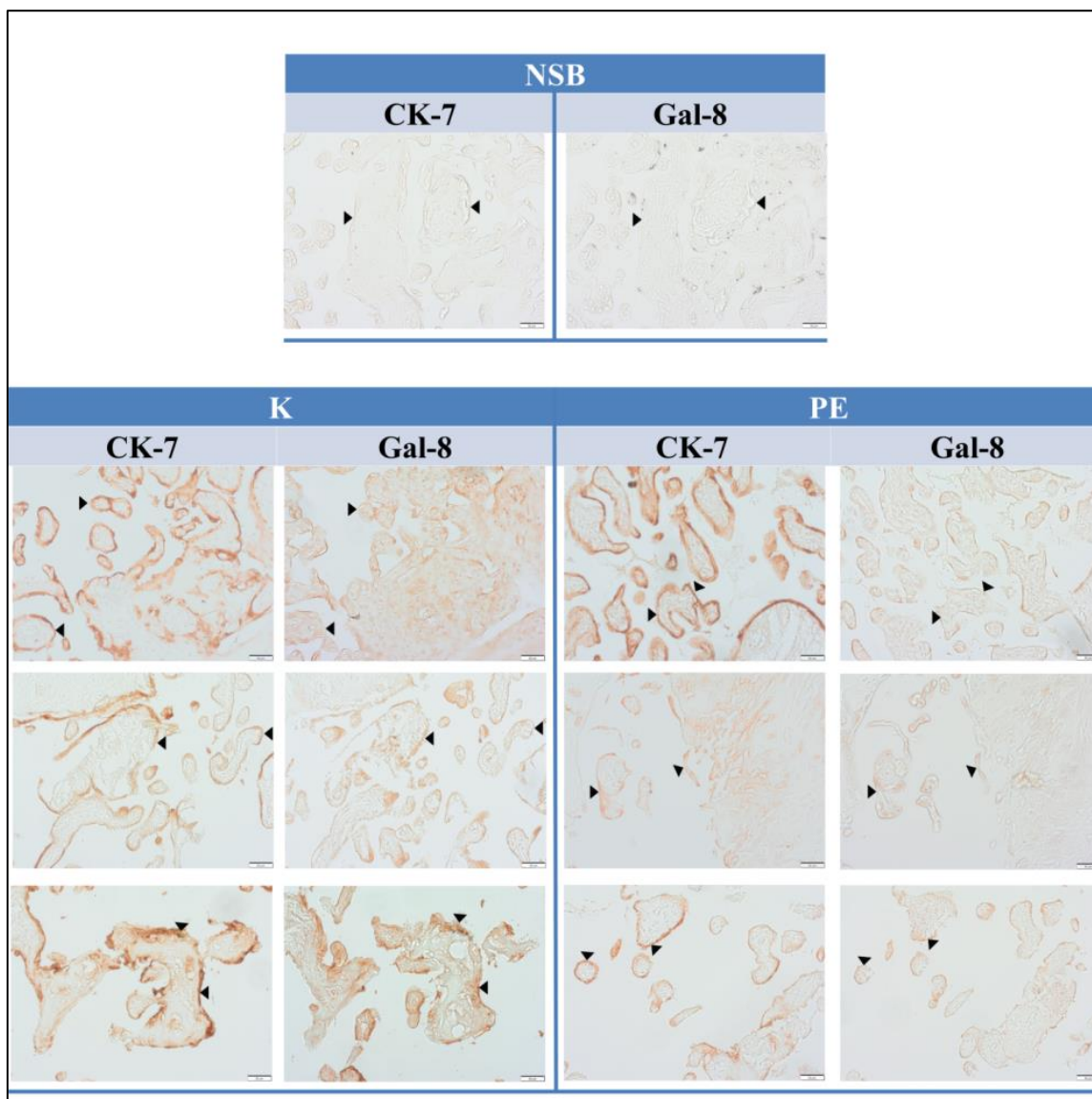
Analiza ekspresije galektina-8 na proteinskom nivou primenom Western blot metode nije pokazala statistički značajnu razliku između zdravih trudnoća i trudnoća komplikovanih preeklampsijom (**Slika 26**). Srednje vrednosti K i PE grupe redom su: $0,479 \pm 0,051$ i $0,469 \pm 0,054$ (arbitrarne jedinice denzitometrije).



Slika 26. Ekspresija proteina galektina-8 u tkivu placenti nakon zdravih trudnoća i trudnoća komplikovanih preeklampsijom. (A) Rezultati su prikazani kao relativni nivoi ekspresije galektina-8 (arbitrarne jedinice denzitometrije) u odnosu na GAPDH + SEM, koji je služio kao kontrolni marker količine nanetog uzorka. K - kontrolna zdrava grupa (n = 9), PE - grupa sa preeklampsijom (n = 7). (B) Reprezentativna slika membrane nakon Western blot metode. Galektin-8 je detektovan kao proteinska traka na oko 60 kDa.

4.4.3 Imunolokalizacija galektina-8 u tkivu placenti nakon normalne trudnoće i trudnoće sa preeklampsijom

Primenom imunohistohemijske metode za procenu lokalizacije galektina-8 u tkivu placenti, ispitivan je obrazac i nivo imunopozitivnosti na galektin-8, kako bi se uočile potencijalne razlike između zdrave kontrolne grupe i grupe sa dijagnozom preeklampsije. Imunohistohemijska analiza galektina-8 pokazala je varijabilne rezultate, pri čemu je u normalnim tkivima, kao i u onima komplikovanim preeklampsijom, intenzitet imunoreakcije bio različit. Pojedini uzorci iz grupe tkiva placenti nakon trudnoće komplikovane preeklampsijom, imali su slabo izraženu ekspresiju galektina-8, ali zbog velike varijabilnosti unutar svake od ispitivanih grupa, nije bilo moguće doći do nedvosmislenog zaključka o smanjenoj ekspresiji ovog proteina sa prisustvom preeklampsije (**Slika 27**). Takođe, značajna varijabilnost je uočena i u obrascima imunopozitivnosti unutar svake od ispitivanih grupa. Ekspresija galektina-8 se u većini slučajeva poklapala sa ekspresijom CK-7, što ukazuje na to da ćelije trofoblasta u najvećoj meri ispoljavaju ovaj lektin u tkivu placenti. Takođe, povremeno se uočavala pozitivnost u ćelijama decidue. Intenzitet bojenja je bio varijabilan unutar ispitivanih grupa. Imajući to u vidu, dalja istraživanja sa značajno većim brojem uzoraka i dodatnim metodama kvantifikacije su neophodna kako bi se utvrdile potencijalne razlike u ekspresiji galektina-8 u tkivu placenti zdravih i patoloških trudnoća, koje bi ukazale na učešće galektina-8 u patofiziologiji preeklampsije.



Slika 27. Imunohistohemijska analiza lokalizacije i ekspresije galektina-8 u uzorcima tkiva placenti nakon zdrave trudnoće (K) i trudnoće komplikovane preeklampsijom (PE). Citokeratin-7 (CK-7) je korišćen kao marker trofoblastnih ćelija. NSB – kontrola nespecifičnog vezivanja (eng. *Non-Specific Binding*). Strelice označavaju približno ista mesta u tkivu radi lakše orijentacije i poređenja. Merna skala –50 μ m, originalno uveličanje 200 \times .

DISKUSIJA

Invazija EVT ćelija je ključna za pravilno formiranje placente, jer omogućava njeno pričvršćivanje za zid uterusa i adekvatan protok krvi ka fetusu kroz remodelovanje spiralnih arterija. Ovaj proces regulišu brojni faktori, uključujući galektine, među kojima su galektin-1 [107] i galektin-3 [108] već prepoznati kao značajni modulatori, dok je galektin-8 prisutan u vilusnim i ekstravilusnim trofoblastima [91]. Njegova lokalizacija [91], uticaj na migraciju i invaziju u drugim ćelijskim sistemima [75,78,83,128,129], kao i interakcije sa adhezionim molekulima [69], ukazuju na moguću ulogu u regulaciji funkcije trofoblasta, iako njegova uloga u EVT ćelijama nije direktno ispitivana. Zbog toga je u ovom radu analiziran uticaj galektina-8 na funkcionalna svojstva trofoblasta, uključujući MMP-2, MMP-9 i integrine $\alpha 1$ i $\beta 1$, kao i njegova ekspresija u HTR-8/SVneo ćelijama u poređenju sa JAR i JEG-3 linijama i u placentama komplikovanim preeklampsijom, kako bi se ovi nalazi povezali sa dobijenim rezultatima.

Uprkos opsežnoj pretrazi dostupne literature, nisu pronađeni podaci o nivou galektina-8 u placenti. Međutim, postoje podaci o njegovim nivoima u cirkulaciji, odnosno u plazmi i serumu zdravih ispitanika. Prema jednoj studiji, srednja koncentracija galektina-8 u plazmi iznosila je 0,25 ng/ml [130], dok je u drugoj studiji zabeležena srednja koncentracija u serumu od 19,4 ng/ml [131]. S obzirom na to da su navedene vrednosti određene u uzorcima seruma ili plazme, pretpostavlja se da bi koncentracije galektina-8 u tkivima, naročito u mikrookruženjima u kojima galektini deluju putem autokrine ili parakrine signalizacije, mogle biti znatno više. Ova pretpostavka podržava eksperimentalni pristup korišćenja koncentracija rh galektina-8 u *in vitro* uslovima, korišćenih u ovom radu, kako bi se simulirali lokalni efekti prisustva ovog proteina u fiziološkom kontekstu.

Analiza funkcije galektina-8 u normalnim trofoblastnim ćelijama obuhvatila je primenu dva pristupa: dodavanje rh galektina-8 i njegovo ciljano utišavanje u ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo. Egzogeno dodati rh galektin-8 oponaša parakrino dejstvo decidualnog galektina-8, dok je ciljanim utišavanjem njegove ekspresije ispitivana njegova autokrino uloga u trofoblastu. Ovim eksperimentima ispitivana je njegova uloga u ključnim procesima kao što su ćelijska adhezija, migracija i invazija. Pored toga, analiziran je uticaj na ekspresiju molekularnih markera koji karakterišu invazivni fenotip trofoblasta, uključujući integrinske podjedinice $\alpha 1$ i $\beta 1$, kao i MMP-2 i MMP-9.

Analiza vijabilnosti ćelija HTR-8/SVneo pomoću MTT testa pokazala je da tretman rh galektinom-8 ne dovodi do promena u ćelijskoj vijabilnosti. Pored toga, rezultati komet testa nisu ukazali na prisustvo genotoksičnih efekata rh galektina-8, što je omogućilo da se rh galektin-8 koristi u navedenim koncentracijama u daljim ispitivanjima. Sa druge strane, ciljano utišavanje ekspresije galektina-8 takođe nije dovelo do statistički značajnih promena u ćelijskoj vijabilnosti, što sugerise da galektin-8 nije neophodan za osnovno preživljavanje ovih ćelija u datim uslovima. Ova procena je sprovedena kako bi se osiguralo da su uočeni efekti u daljim funkcionalnim analizama, poput analize adhezije, migracije i invazije, nezavisni od potencijalnih promena u ćelijskoj održivosti izazvanih manipulacijom ekspresije galektina-8. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima u kojima je ispitivana uloga drugih članova porodice galektina u trofoblastnim ćelijama. Na primer, utišavanje galektina-3 nije uticalo na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija [108], dok blokiranje galektina-1 funkcionalnim antitelom takođe nije imalo značajan efekat na preživljavanje HTR-8/SVneo ćelija [107]. Sa druge strane, pokazano je da rh galektin-8 povećava proliferaciju U87 ćelija glioblastoma, dok je utišavanje ekspresije ovog galektina imalo suprotan efekat [78]. U jednoj studiji je utvrđeno da galektin-8 može stimulisati proliferaciju keratinocita, pri čemu je njegova pojačana ekspresija dovela do povećane ćelijske proliferacije i razvoja epidermalne hiperplazije kod psorijaze [132]. Ove razlike u biološkim efektima galektina-8 na različite ćelijske tipove mogu ukazivati na specifičnost njegovih efekata zavisno od tipa ćelija.

Analiza ćelijskog ciklusa pokazala je tendenciju povećanja procenta ćelija u G0/G1 i S fazama nakon tretmana rh galektinom-8, iako razlike između tretiranih i kontrolnih grupa nisu bile statistički značajne. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim studijama koje su pokazale da galektin-8 može inhibirati proliferaciju u ćelijskoj liniji nesitnoćelijskog karcinoma pluća H1299, putem

indukcije akumulacije ciklin-zavisnog inhibitora p21. Poznato je da akumulacija p21 može biti posredovana aktivacijom signalnih puteva koji uključuju c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) i protein kinazu B (PKB/Akt), čija je fosforilacija značajno povećana u ćelijama tretiranim galektinom-8 [133]. Inhibitor p21, zajedno sa srodnim inhibitorima p27 i p57, blokira progresiju ćelijskog ciklusa u kontrolnim tačkama G1/S i G2/M formiranjem ternarnih kompleksa sa ciklin-zavisnim kinazama, čime se inhibira njihova enzimatska aktivnost [134]. U skladu sa ovim rezultatima, u ovom istraživanju je zabeleženo blago, ali statistički značajno smanjenje učestalosti ćelija u G2/M fazi ciklusa za sve testirane koncentracije galektina-8, što ukazuje na potencijalnu ulogu galektina-8 u modulaciji ćelijskog ciklusa trofoblastnih ćelija. Ova promena ukazuje na to da galektin-8 inhibira progresiju ćelijskog ciklusa u mitozu. To je u saglasnosti sa studijom u kojoj je na HaCaT keratinocitima koji ne eksprimiraju galektin-8 pokazana smanjena proliferacija, kao posledica usporenog prelaska iz mitoze u G1 fazu ćelijskog ciklusa [132]. Prethodne studije su pokazale da drugi članovi familije galektina mogu imati važnu ulogu u ćelijskom odgovoru na oštećenje DNK i kontroli progresije kroz ćelijski ciklus. Na primer, u HeLa ćelijama sa utišanim genom za galektin-3, *LGALS3*, izloženim različitim agensima za oštećenje DNK, zabeležen je odloženi odgovor na popravku oštećenja DNK [135]. Slično tome, u ćelijama glioma, utišavanje galektina-1 i -3 dovelo je do smanjene rezistencije na radioterapiju, uz povećano oštećenje DNK izazvano zračenjem [136]. U većini studija koje se bave rakom dojke, pokazano je da galektin-3 ima zaštitnu ulogu u preživljavanju ćelija, uključujući mehanizme odgovora na oštećenje DNK, popravku genetičkog materijala i inhibiciju ćelijske smrti nakon hemoterapije [137]. Na osnovu ovih rezultata, može se pretpostaviti da bi galektin-8, slično drugim članovima galektinske porodice, mogao učestvovati u regulaciji ćelijskog preživljavanja i zaštiti od genotoksičnih oštećenja. Ipak, ta uloga galektina-8 još uvek nije potvrđena i zahteva dodatna istraživanja.

Prethodne studije su pokazale da galektin-8 može modulirati adhezivne osobine ćelija, pri čemu njegov efekat zavisi od eksperimentalnih uslova, može delovati stimulatивно ili inhibitoryno na ćelijsku adheziju [80,81,138]. Kada je vezan za podlogu, galektin-8 podstiče adheziju ćelija preko integrina [81]. Suprotno tome, u višku kao solubilni ligand, on sa integrinima formira kompleks koji inhibira adheziju [81]. Takođe, uloga solubilnog galektina-8 zavisi od prisustva njegovih liganada na površini ćelije i u njenom okruženju [81]. U okviru ovog istraživanja, ispitivan je uticaj rh galektina-8 na adheziju HTR-8/SVneo ćelija na tri različite podloge: plastiku, kolagen tipa I i Matrigel. Važno je napomenuti da je prisustvo galektina-8 u Matrigelu već dokumentovano [108]. U rezultatima ove doktorske disertacije je pokazan stimulatívni efekat galektina-8 na adheziju ćelija na Matrigelu pri koncentraciji od 50 ng/ml, kao i na površinama obloženim kolagenom tipa 1 pri koncentracijama galektina-8 od 100 ng/ml i 200 ng/ml. Dodatak laktoze delimično je inhibirao ovaj efekat, što ukazuje da se delovanje galektina-8 ostvaruje, barem delimično, putem njegove lektinske aktivnosti. Suprotno tome, na plastici nije primećen značajan uticaj rh galektina-8 na adheziju ćelija. U cilju dodatnog razjašnjavanja uloge galektina-8 na ćelije trofoblasta sa aspekta adhezije, sprovedeno je i njegovo ciljano utišavanje u ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo. Rezultati su pokazali da smanjena ekspresija galektina-8 dovodi do statistički značajnog smanjenja adhezije ćelija za plastiku i kolagen tipa 1. Ova konzistentna redukcija adhezije ukazuje na direktan uticaj galektina-8 na adhezivne osobine trofoblastnih ćelija. Zanimljivo je da adhezija za Matrigel nije bila promenjena ni nakon utišavanja galektina-8, što se potencijalno može objasniti prisustvom endogenog galektina-8 u samom Matrigelu [108]. Matrigel je korišćen kao model vanćelijskog matriksa decidue bogat lamininom, fibronektinom i kolagenom tipa IV. Ovi rezultati ukazuju da efekat galektina-8 na adheziju trofoblasta zavisi od vrste podloge, te da specifične komponente matriksa mogu ublažiti posledice utišavanja ekspresije *LGALS8* gena. Zavisnost uticaja galektina-8 na adheziju ćelija trofoblasta od vrste podloge odražava složenost ćelijsko-matriksnih interakcija i potencijalne kompenzatorne mehanizme. Ranija istraživanja su pokazale dvostruku funkcionalnu ulogu galektina-8: dok njegova imobilizovana forma podstiče vezivanje ćelija, širenje i migraciju, solubilni oblik može delovati inhibitoryno na adheziju [81]. Funkcionalni efekat zavisi od oblika,

koncentracije i mikrokruženja u kojem se galektin-8 nalazi. Sa druge strane, tretman rh galektinom-3 ili njegovim specifičnim inhibitorom I47 nije uticao na adheziju HTR-8/SVneo ćelija, bez obzira na vrstu podloge [108]. Ovi podaci ukazuju na to da različiti članovi porodice galektina mogu imati različit uticaj na adheziju trofoblata. Takođe, ukazuju i na specifičnu ulogu galektina-8 u modulaciji ćelijsko-matriksnih interakcija tokom rane trudnoće. U drugim tipovima ćelija, poput trabekularne mreže oka, pokazano je da galektin-8 podstiče adheziju i širenje ćelija [139]. Naši rezultati potvrđuju da galektin-8 ima ovakav efekat i u trofoblastnim ćelijama.

Rezultati ove doktorske teze su pokazali da rh galektin-8 deluje stimulatивно na migraciju i invaziju trofoblastnih ćelija, što je u skladu sa polaznom hipotezom. Ovaj efekat je neutralisan dodatkom laktoze što ukazuje na to da galektin-8 ostvaruje svoj efekat interakcijama lektinskog tipa. Poznato je da galektin-8 utiče na migraciju i drugih tipova ćelija. Na primer, kod U87 ćelija glioblastoma egzogeno dodati galektin-8 povećao je hemotaksu [78], dok je rh galektin-8 stimulisao migraciju endotelnih ćelija vene pupčanika *in vitro*, u prisustvu vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) [140]. Nasuprot tome, u jednoj studiji, imunohistohemijska analiza otkrila je značajno smanjenu ekspresiju galektina-8 u malignom tkivu kolona u poređenju sa normalnim i displastičnim tkivom, pri čemu ovaj protein smanjuje migraciju ćelija karcinoma kolona [141]. Efekti slični pokazanim u ovom radu, primećeni su i kod drugih ćelijskih tipova. Tako je pokazano da galektin-1 i galektin-3, a u manjoj meri i galektin-8, stimulišu migraciju ćelija glioblastoma (T98G and U373 ćelijske linije) *in vitro* [128]. Uticaj galektina-8 na invaziju trofoblastnih ćelija bi mogao biti posredovan kako parakrinim, tako i autokrinim mehanizmima, s obzirom na to da i same trofoblastne ćelije otpuštaju ovaj lektin u ekstracelularnu sredinu [142]. Sa druge strane, utišavanje gena za galektin-8 u našoj studiji dovelo je do suprotnog efekta u odnosu na tretman rekombinovanom proteinom, kada su u pitanju migracija i invazija ćelija. Rezultati pokazuju da smanjena ekspresija galektina-8 značajno narušava migracione i invazivne sposobnosti HTR-8/SVneo ćelija, čime se dodatno potvrđuje njegoa potencijalna uloga u placentaciji. Rezultati studija na drugim galektinima takođe potvrđuju ovaj koncept. Na primer, utišavanje galektina-3 značajno je smanjilo migraciju i invaziju ćelija, a ti efekti su poništeni dodatkom rekombinovanog humanog galektina-3 [108]. Slično tome, utišavanje galektina-14 u primarnim trofoblastnim ćelijama dovelo je do smanjene migracije i invazije, dok je njegoa prekomerna ekspresija u HTR-8/SVneo ćelijama povećala obe funkcije [106]. Ova paralelna zapažanja ukazuju da pojedini galektini mogu imati specifične, ali komplementarne uloge u regulaciji invazije trofoblata. Pored toga, ovi rezultati, zajedno sa podacima iz literature na drugim tipovima ćelija, ukazuju da galektin-8 može imati složenu ulogu u regulaciji ćelijske pokretljivosti zavisnu od tipa ćelija i tkiva. Prethodna istraživanja pokazala su da još dva člana porodice galektina, galektin-1 [107] i galektin-3 [108], takođe učestvuju u procesu invazije trofoblata. Istovremeno smanjenje adhezije, migracije i invazije nakon utišavanja galektina-8 sugeriše da ovaj protein ima značajnu ulogu u koordinaciji pokretljivosti trofoblastnih ćelija. Njegovo odsustvo verovatno narušava mrežu adhezivnih i signalnih interakcija koje su neophodne za efikasnu migraciju ćelija i remodeliranje tkiva. U kombinaciji sa prethodno potvrđenim prisustvom galektina-8 u EVT ćelijama [91], ovi nalazi ukazuju da ovaj lektin može delovati kao važan lokalni parakrini medijator u procesu invazije trofoblata.

Radi boljeg razumevanja mehanizama putem kojih galektin-8 utiče na funkciju trofoblastnih ćelija, analizirana je ekspresija molekularnih medijatora ćelijske invazije – integrina i MMP u ćelijskoj liniji HTR-8/SVneo. Kod HTR-8/SVneo ćelija sa utišanom ekspresijom galektina-8 primećeno je blago smanjenje nivoa $\alpha 1$ integrina na proteinskom nivou, dok je nivo $\beta 1$ subjedinice ostao nepromenjen. Ova blaga redukcija $\alpha 1$ integrina može predstavljati finu regulatornu adaptaciju, koja potencijalno utiče na ćelijsku adheziju ili signalne puteve, bez izazivanja šire promene u integrinskom profilu. Prethodna istraživanja su pokazala da galektin-1 ima ključnu ulogu u regulaciji interakcija između trofoblata i endotelnih ćelija, posredstvom modulacije integrina $\alpha 1$ i $\beta 1$, koji su od suštinskog značaja za razvoj placentе [143]. Takođe je utvrđeno da integrin $\beta 1$

predstavlja ligand galektina-1 u humanim trofoblastnim ćelijama [144]. Pored toga, pokazano je da galektin-8 ima sposobnost vezivanja integrina $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ i $\alpha 5\beta 1$ u lizatima Jurkat T ćelija, dok je adhezija galektina-8 za ove ćelije posredovana prvenstveno putem interakcije sa integrinom $\alpha 5\beta 1$ [86].

MMP-2 i MMP-9 su ključni enzimi u remodeliranju endometrijalnog tkiva, uključujući adaptaciju vaskulature uterusa tokom trudnoće, jer omogućavaju razgradnju komponenti ECM i doprinose invaziji citotrofoblasta [145]. U ovom istraživanju, galektin-8 pri koncentraciji od 50 ng/ml stimulusao je ekspresiju iRNK za MMP-2, dok nivo iRNK za MMP-9 nije bio značajno promenjen. U kondicioniranom medijumu HTR-8/SVneo ćelija tretiranih galektinom-8 pri koncentracijama od 50 i 100 ng/ml, zabeleženo je povećanje aktivnosti MMP-2 i MMP-9, što ukazuje na povećan nivo ovih proteaza. Povećan nivo ovih enzima ukazuje da galektin-8 može imati značajnu ulogu prilikom invazije trofoblasta i placentaciji. Podaci iz literature koji povezuju galektin-8 sa regulacijom MMP enzima su ograničeni. Međutim, pokazano je da galektin-8 može pozitivno uticati na obradu proMMP-9 koja je posredovana MMP-3 u neutrofilima čoveka [85]. Pored efekta rh galektina-8, u ovom istraživanju analiziran je i uticaj utišavanja gena *LGALS8* na ekspresiju i aktivnost MMP-2 i MMP-9 u HTR-8/SVneo ćelijama. Želatinolitička aktivnost MMP-9 značajno je smanjena pri utišavanju *LGALS8*, dok je aktivnost MMP-2 pokazala blagu tendenciju opadanja u ćelijama sa utišanim *LGALS8* u poređenju sa kontrolnom grupom, iako ta razlika nije bila statistički značajna. Radi razjašnjenja potencijalnih mehanizama regulacije MMP galektinom-8, analizirane su koncentracije TIMP-1 i TIMP-2, endogenih inhibitora MMP-9 i MMP-2 u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija sa utišanim *LGALS8*. Aktivnost TIMP-1 ostala je nepromenjena, što ukazuje da u ćelijama trofoblasta inhibicija verovatno nije posredovana MMP-9. Slično tome, iako je aktivnost TIMP-2 bila smanjena, to nije rezultiralo povećanjem aktivnosti MMP-2, što sugerise da su u regulaciju uključeni i drugi mehanizmi. Ovi rezultati ukazuju na to da galektin-8 učestvuje u regulaciji aktivnosti MMP u trofoblastu, verovatno putem indirektnih ili kontekstualno zavisnih puteva, a ne direktnom modulacijom ekspresije TIMP proteina. Dalja istraživanja alternativnih regulatora MMP enzima ili signalnih kaskada koje su pod uticajem galektina-8 mogla bi pružiti dublji uvid u njegovu funkcionalnu ulogu u biologiji trofoblasta.

Galektini učestvuju u brojnim fiziološkim i patološkim procesima. Tokom rane trudnoće, oni imaju važnu ulogu u implantaciji, razvoju placente, angiogenezi i imunološkoj toleranciji, a povezani su i sa nastankom i progresijom karcinoma [146–148]. U osnovi invazije kancerskih i trofoblastnih ćelija leže slični mehanizmi, poput EMT, procesa u kojem epitelne ćelije gube stabilnost i međusobne veze, a stiču osobine mezenhimalnih ćelija poput pokretljivosti i invazivnosti, i razgradnje ECM [30,149]. Ključna razlika je u tome što je invazija trofoblasta strogo vremenski i prostorno kontrolisan proces. Kako bi se ispitala potencijalna povezanost galektina-8 sa malignom transformacijom trofoblasta, u ovom radu je ispitivana njegova ekspresija i lokalizacija u normalnim trofoblastnim ćelijama i ćelijama horiokarcinoma (JAR i JEG-3). Galektin-8 je prethodno dokumentovan u tkivu placente prvog trimestra trudnoće, i to u vilusnom i ekstravilusnom trofoblastu [91]. U ovoj studiji je utvrđeno da su nivoi iRNK i proteina galektina-8 znatno viši u HTR-8/SVneo ćelijama u poređenju sa JAR i JEG-3 ćelijskim linijama. Uporedna analiza galektina-8 otkrila je prisustvo više transkripata gena *LGALS8*, kao i različitih izoformi galektina-8, što ukazuje na to da je u ispitivanim ćelijskim linijama došlo do alternativnog splajsovanja (eng. *splicing*) RNK. Prisustvo dva transkripta (1077 i 951 bp) je zabeleženo i u različitim kancerskim ćelijskim linijama [150]. Primenom monoklonskog anti-galektin-8 antitela detektovane su najmanje dve izoforme galektina-8 u svim ispitivanim ćelijskim linijama. Western blot analiza je pokazala različite proporcije splajs varijanti galektina-8 pri čemu je u HTR-8/SVneo ćelijama zabeležena veća relativna ekspresija ~34 kDa varijante i manja zastupljenost ~40 kDa izoforme u poređenju sa JAR i JEG-3 ćelijskim linijama. Ista analiza je otkrila razlike u nivou galektina-8 između JAR i JEG-3 ćelija uprkos sličnim nivoima *LGALS8* transkripata u obe linije, što ukazuje na postojanje finog mehanizma kontrole translacije ovog lektina. Varijacije u ekspresiji

izoformi uočene su i u osteoklastima, kao i u SK-MES-1 humanoj ćelijskoj liniji skvamoznog karcinoma pluća [151,152]. Do sada je biološka funkcija ovih izoformi pokazana samo u osteoklastima, gde je utvrđeno da kratka izoforma galektina-8 ima dominantnu ulogu u resorpciji koštanog matriksa [152]. Razlike u ekspresiji splajs varijanti galektina-8 između HTR-8/SVneo ćelija i horionkarcinomskih linija JAR i JEG-3 ukazuju na moguće učešće ~40 kDa izoforme galektina-8 u malignoj transformaciji trofoblasta, što bi trebalo dalje ispitati. Imunocitohemijska analiza je ukazala na razliku u obrascima ćelijske imunopozitivnosti na galektin-8 među ispitivanim ćelijskim linijama, dok je analiza prisustva ovog proteina u ćelijskim frakcijama omogućila detekciju varijacija u unutarćelijskoj lokalizaciji i ekspresiji galektina-8 između ispitivanih ćelijskih linija, ukazujući na razlike specifične za tip ćelija. Rezultate Western blot analize nakon ćelijskog fracionisanja treba oprezno tumačiti, imajući u vidu da se ovim protokolom dobijaju frakcije složenog sastava. Tako, membranska frakcija pored ćelijske membrane sadrži i ostale membrane poput spoljašnje i unutrašnje membrane mitohondrija, kao i membrane endoplazmatskogretikuluma i Goldžijevog aparata. Pored toga, postupak uključuje hemijski tretman koji može uticati na dostupnost epitopa za vezivanje antitela u imunohemijskim tehnikama. Galektin-8 je pretežno detektovan u membranskoj frakciji ćelije, ne samo kao traka od približno 34 kDa, već prvenstveno u oblastima viših molekulskih masa. Ovakvo zapažanje ukazuje na to da se galektin-8 vezuje za do sada neidentifikovane biološke ligande u trofoblastu, ili potencijalno da je detektovan dimer galektina-8. Na osnovu objavljenih podataka za druge tipove ćelija [69,141], može se očekivati da galektin-8 deluje i unutar ćelije i u njenoj spoljašnjoj sredini kod trofoblasta. Dobijeni rezultati pokazuju da galektin-8 postoji ili kao slobodni molekul ili u kompleksima visoke molekulske mase. Mnogi proteini u trofoblastu, poput laminina, fibronektina, integrina i mucina 1, imaju potencijal da interaguju sa galektinima, međutim, mnogi potencijalni ligandi ostaju neidentifikovani. Pored toga, potrebno je utvrditi da li i na koji način različiti proteinski kompleksi učestvuju u regulaciji invazije normalnih i transformisanih trofoblastnih ćelija, kao i drugih funkcija trofoblasta. Identifikacija novih partnera galektina-8 u proteinskim kompleksima mogla bi predstavljati fokus budućih istraživanja. Podaci prikazani ovde pokazuju da je galektin-8 različito eksprimiran i lokalizovan u normalnim i transformisanim trofoblastnim ćelijama, što ukazuje na moguću ulogu određenih izoformi galektina-8 u patologiji horiokarcinoma. S obzirom na pokazanu povezanost sa brojnim kancerima, galektin-8 može poslužiti kao ciljni molekul za različite terapijske pristupe. Među njima su siRNA molekuli, neutralizujuća antitela, ugljeno-hidratni inhibitori, kao i druge vrste inhibitora [153].

Pored učešća u malignoj transformaciji, pokazano je da pojedini članovi familije galektina igraju ulogu u različitim patološkim stanjima u trudnoći. U ovoj doktorskoj disertaciji smo ispitivali potencijalnu povezanost galektina-8 sa PE – ozbiljnim multisistemskim stanjem sa mogućim ozbiljnim posledicama po majku i fetus koje se najčešće manifestuje u trećem trimestru gestacije. U poslednjim godinama zabeležen je značajan porast studija koje ukazuju na izmenjenu ekspresiju galektina u različitim patološkim stanjima trudnoće. Poseban fokus u ovoj studiji usmeren je na analizu ekspresije galektina-8 u placentama trudnoća komplikovanim PE. U okviru analize izvršeno je poređenje ekspresije galektina-8 na nivou iRNK i proteina u normalnom placentnom tkivu i tkivu trudnoća komplikovanih PE. Uočena je smanjena ekspresija *LGALS8* u tkivu placenti sa PE u odnosu na zdrave kontrolne placentne, međutim zbog velikih varijacija ispitivanih grupa razlike nisu bile statistički značajne. Varijacije u ekspresiji su bile izražene unutar grupe i na proteinskom nivou. U jednoj studiji, Stowell i saradnici pokazali su da galektin-8 postoji u obliku dimera u leukocitima i da dimerizacija galektina-8 omogućava funkcionalnu bivalenciju svakog CRD domena [154]. Dimer galektina-8 bi mogao biti otporan na denaturaciju, a nije isključena mogućnost formiranja kompleksa sa drugim proteinima. Neke studije su pokazale da se u Western blot analizama galektin-8 može detektovati i u formama veće molekulske mase. Na primer, u jednoj studiji proteini izolovani iz hondrocita kod osteoartritisa pokazali su dodatnu traku na poziciji koja odgovara približnoj molekulskoj masi Galektin-8S (35.8 kDa) dimera [155]. U drugoj studiji, Western blot

analiza sinovijalne tečnosti pacijenata sa reumatidnim artritismom otkrila je izoformu galektina-8 od oko 69 kDa, koja je bila prisutna u različitim količinama [156]. S obzirom na ove rezultate, neophodno je sprovesti dodatna ispitivanja kako bi se razjasnili molekularni mehanizmi odgovorni za pojavu trake od ~60 kDa, uključujući identifikaciju potencijalnih izoformi i interakcija sa drugim proteinima. Takva istraživanja bila bi od značaja za bolje razumevanje biološke uloge galektina-8 u trofoblastu i njegovog potencijalnog doprinosa patogenezi preeklampsije. Trend smanjenja genske ekspresije galektina-8 u rezultatima ukazuje na potencijalnu povezanost galektina-8 sa poremećenom placentacijom i razvojem preeklampsije. Takođe, treba imati u vidu da je studija sprovedena na uzorku relativno malog broja. Stoga je za postizanje statističke značajnosti neophodno obuhvatiti veći broj ispitanica. Pored toga, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se detaljnije razjasnila uloga galektina-8 u patogenezi ovog poremećaja. Brojna istraživanja ukazuju na to da drugi članovi galektinske porodice pokazuju izmenjenu ekspresiju u placematama komplikovanim PE. Najviše podataka postoji za galektin-1, čija je ekspresija u placematama komplikovanim PE povećana u poređenju sa normalnom trudnoćom [94,157]. Međutim, u slučajevima ranog nastupanja PE, zabeležena je njegoa supresija [158,159], kao i smanjena proporcija galektin-1-ekspimirajućih T i NK ćelija u perifernoj krvi [160]. Dodatno, niske koncentracije galektina-1 u serumu tokom drugog trimestra trudnoće identifikovane su kao potencijalni faktor rizika za razvoj ovog poremećaja [161].

U preeklampsiji dolazi do izraženih promena u ekspresiji galektina, koje ukazuju na njihov značaj u patogenezi bolesti. Dok je galektin-2 konzistentno smanjen na nivou iRNK i proteina u EVT ćelijama [162], galektin-3 uglavnom pokazuje povećanu ekspresiju u placenti i serumu trudnica sa PE [163–165], iako postoje podaci o njegovom smanjenju u ranoj preeklampsiji [166]. Istovremeno, povišeni nivoi galektina-7 u serumu [167] i izmenjena ekspresija galektina-9 u imunskim ćelijama [168] dodatno ukazuju na poremećaj imunske ravnoteže kod ovih pacijentkinja. Posebno se izdvaja galektin-13, čija je smanjena ekspresija u placenti, uz pojačano oslobađanje iz ćelije, povezana sa razvojem preeklampsije [169,170]. Ovi rezultati ukazuju da disbalans u ekspresiji različitih galektina predstavlja važnu komponentu poremećene trofoblastne funkcije i imunoregulacije u preeklampsiji.

Dosadašnja istraživanja jasno ukazuju da članovi galektinske porodice imaju značajno izmenjen obrazac ekspresije u placematama komplikovanim PE, što sugerise njihovu potencijalnu ulogu u patogenezi ovog poremećaja. Ovi podaci zajedno naglašavaju da različiti galektini mogu imati divergentne, ali međusobno komplementarne uloge u razvoju i progresiji PE. Istraživanja su identifikovala brojne potencijalne biomarkere preeklampsije, a među galektinima, galektin-13 se izdvaja kao najperspektivniji kandidat za dijagnozu i prognozu bolesti [171], što ističe potrebu za daljim proučavanjem ostalih galektina.

Razlike u ekspresiji galektina-8 među uzorcima tkiva placentu u okviru zdrave i grupe sa preeklampsijom ukazuju da je potrebno sprovesti istraživanja na značajno većem broju uzoraka kao i mehanističke studije, kako bi se razjasnila njegoa uloga u preeklampsiji i kao i mogućnost potencijalne primene kao biomarkera ili kao polazna tačka za razvoj ciljanih terapeutika.

ZAKLJUČCI

1. Na osnovu rezultata analize uključenosti galektina-8 u funkcijska svojstva ćelija trofoblasta čoveka *in vitro* možemo zaključiti sledeće:
 - Egzogeno dodavanje rh galektina-8 *in vitro* ne utiče na vijabilnost ćelija trofoblasta čoveka niti ispoljava genotoksično dejstvo. Isto tako, i utišavanje ekspresije endogenog galektina-8 ne utiče na vijabilnost ovih ćelija.
 - Egzogeno dodat rh galektin-8 stimuliše adheziju, migraciju i invaziju trofoblastnih ćelija, dok utišavanje njegove ekspresije dovodi do značajnog smanjenja ovih procesa. Galektin-8 ostvaruje ovaj efekat putem interakcija lektinskog tipa.
 - Mehanizam delovanja rh galektina-8 na invaziju trofoblasta delimično uključuje povećanje nivoa MMP-2 i -9. Nasuprot tome, smanjenje invazije usled utišavanja ekspresije *LGALS8*, uzrokovano je smanjenjem nivoa MMP-9. Smanjenje ekspresije integritivne jedinice $\alpha 1$ doprinosi smanjenoj invaziji trofoblasta uzrokovanoj utišavanjem *LGALS8*.
2. Na osnovu poređenja ekspresije i unutarćelijske lokalizacije galektina-8 u ćelijama maligno transformisanog trofoblasta - horiokarcinoma i normalnim ćelijama trofoblasta *in vitro* zaključujemo sledeće:
 - Galektin-8 je značajno više ekspimiran u normalnim trofoblastnim HTR-8/SVneo ćelijama u odnosu na horiokarcinomske JAR i JEG-3 ćelije i na nivou iRNK i na proteinskom nivou;
 - U sva tri ćelijska tipa je uočeno prisustvo dva transkripta i najmanje dve molekulske izoforme galektina-8, pri čemu se zastupljenost ovih formi razlikuje između ispitivanih ćelijskih linija;
 - Uočena je različita unutarćelijska distribucija galektina-8 između ispitivanih ćelijskih linija - pored dominantne membranske lokalizacije, i u manjoj meri lokalizacije u solubilnoj nukleusnoj frakciji, u horiokarcinomskim ćelijama uočava se i prisustvo citoplazmatske frakcije;
3. Na osnovu poređenja ekspresije i lokalizacije galektina-8 u tkivu placenti iz trudnoća komplikovanih preeklampsijom i placenti iz zdravih trudnoća donosimo sledeće zaključke:
 - Nije uočena značajna razlika u ekspresiji galektina-8 u tkivu placenti ni na iRNK, ni na proteinskom nivou između zdravih i preeklampsijskih trudnoća. Uočene su značajne individualne varijacije u imunolokalizaciji i intenzitetu ekspresije galektina-8 u tkivu kako zdravih tako i trudnoća komplikovanih preeklampsijom.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je galektin-8 važan regulator funkcije zdravog i maligno izmenjenog trofoblasta. Promene u njegovoj ekspresiji u maligno transformisanom trofoblastu ukazuje na moguće učešće galektina-8 u karcinogenezi. Što se njegove uloge u preeklampsiji tiče, potrebno je sprovesti ispitivanja na većem broju uzoraka kako bi se pokazalo da li galektin-8 igra ulogu u jednoj od najozbiljnijih i najčešćih patologija trudnoće. Dalja istraživanja uloge galektina-8 u trudnoći mogla bi doprineti razvoju novih dijagnostičkih i terapijskih pristupa kad je preeklampsija u pitanju.

LITERATURA

1. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* [Internet]. 2004;114(5–6):397–407. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15507270/>
2. Wang Y, Zhao S. Cell Types of the Placenta. In: *Vascular Biology of the Placenta* [Internet]. Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53245/>
3. Napso T, Yong HEJ, Lopez-Tello J, Sferruzzi-Perri AN. The role of placental hormones in mediating maternal adaptations to support pregnancy and lactation. *Front Physiol*. 2018;9(AUG):387601.
4. Landon MB., Galan HL., Jauniaux ERM., Driscoll DA., Berghella V, Grobman WA., Kilpatrick SJ., Cahill AG., editors. *Obstetrics: Normal and Problem Pregnancies* [Internet]. Elsevier; 2025. Available from: https://books.google.com/books/about/Obstetrics_Normal_and_Problem_Pregnancie.html?hl=sr&id=uJIsEQAAQBAJ
5. Betts JG, Young KA, Wise JA, Johnson E, Poe B, Kruse DH, Korol O, Johnson JE, Womble M, DeSaix P. *Anatomy and Physiology* [Internet]. Houston, Texas: OpenStax; 2013. Available from: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/28-2-embryonic-development>
6. Reed BG, Carr BR. The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation. [Updated 2018 Aug 5]. In: Feingold KR, Ahmed SF, Anawalt B et al., editor. *Endotext* [Internet] Comprehensive FREE Online Endocrinology Book [Internet]. South Dartmouth (MA): MDTtext.com, Inc.; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279054/>
7. Haroun HS. Reproductive cycles in females. *MOJ Women’s Heal* [Internet]. 2016;2(2):62–4. Available from: <http://www.rnlkwc.ac.in/pdf/study-material/zoology/ZOO65.pdf>
8. Taraborrelli S. Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet Gynecol Scand* [Internet]. 2015;94(S161):8–16. Available from: <https://doi.org/10.1111/aogs.12771>
9. Lyr1. File:MenstrualCycle2.png - Wikimedia Commons [Internet]. Available from: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MenstrualCycle2.png>
10. Ferin M, Jewelewicz R, Warren MP. *The Menstrual Cycle: Physiology, Reproductive Disorders, and Infertility* [Internet]. New York: Oxford University Press; 1993. Available from: https://books.google.rs/books?hl=sr&lr=&id=fn75vzBLhLIC&oi=fnd&pg=PA3&dq=free+book+menstrual+cycle&ots=7KJMbzEtS3&sig=aXvYKM0stXY4CacPLPujPywU8XI&redir_esc=y#v=onepage&q=free book menstrual cycle&f=false
11. Gupta SK. Chapter Twelve - The Human Egg’s Zona Pellucida. In: Litscher ES, Wassarman PMBT-CT in DB, editors. *Extracellular Matrix and Egg Coats* [Internet]. Academic Press; 2018. p. 379–411. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0070215318300012>
12. Lanford HC, Roudebush WE, Chosed RJ. Molecular and Cellular Mechanisms Underlying Preimplantation Embryo Development. In: Wu B, editor. London: IntechOpen; 2022. Available from: <https://doi.org/10.5772/intechopen.106693>

13. Ng S-W, Norwitz GA, Pavlicev M, Tilburgs T, Simón C, Norwitz ER. Endometrial Decidualization: The Primary Driver of Pregnancy Health. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. 2020.
14. Murata H, Tanaka S, Okada H. The Regulators of Human Endometrial Stromal Cell Decidualization [Internet]. Vol. 12, *Biomolecules*. 2022. p. 1275. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/9/1275>
15. Tal R, Taylor HS. Endocrinology of Pregnancy. [Updated 2021 Mar 18]. In: Feingold KR, Adler RA, Ahmed SF, et al. E, editor. *Endotext* [Internet] South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc; 2000- [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278962/>
16. Ttrue12. File:Human Fertilization.png - Wikimedia Commons [Internet]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Human_Fertilization.png
17. Pfeffer PL, Pearton DJ. Trophoblast development. *REPRODUCTION* [Internet]. 2012;143(3):231–46. Available from: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/143/3/231.xml>
18. Turco MY, Moffett A. Development of the human placenta. *Development* [Internet]. 2019;146(22):dev163428. Available from: <https://doi.org/10.1242/dev.163428>
19. NinaSes. File:Бластоциста человека 5-е сутки развития.jpg - Wikimedia Commons [Internet]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Бластоциста_человека_5-е_сутки_развития.jpg
20. Xaviour R. *Essentials of Human Embryology*. In: 2nd Editio. Elsevier India; 2024. p. 131.
21. Knöfler M, Haider S, Saleh L, Pollheimer J, Gamage TKJBJB, James J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2019;76(18):3479–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31049600/>
22. James JL, Lissaman A, Nursalim YNS, Chamley LW. Modelling human placental villous development: designing cultures that reflect anatomy. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2022;79(7):384. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04407-x>
23. Burton, Graham J., Barker, David. J. P., Moffett, Ashley., Thornburg K, editor. *The Placenta and Human Developmental Programming*. Cambridge University Press; 2011. 102 p.
24. Loke YW, King A. Human Trophoblast Development. In: *Human Implantation: Cell Biology and Immunology* [Internet]. Cambridge University Press; 1995. Available from: [https://books.google.rs/books?hl=en&lr=&id=GzF0LBWkS-MC&oi=fnd&pg=PR8&dq=Loke+YW+and+King+A+\(1995\).+Human+trophoblast+development.+In:+Human+implantation:+Cell+biology+and+immunology.+Cambridge:+Cambridge+University+Press,+32–62.+Maquoi&ots=bjA9r8xwPt&s](https://books.google.rs/books?hl=en&lr=&id=GzF0LBWkS-MC&oi=fnd&pg=PR8&dq=Loke+YW+and+King+A+(1995).+Human+trophoblast+development.+In:+Human+implantation:+Cell+biology+and+immunology.+Cambridge:+Cambridge+University+Press,+32–62.+Maquoi&ots=bjA9r8xwPt&s)
25. Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* [Internet]. 1983;4(4):397–413. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6634666/>
26. Carvajal L, Gutiérrez J, Morselli E, Leiva A. Autophagy Process in Trophoblast Cells

Invasion and Differentiation: Similitude and Differences With Cancer Cells. *Front Oncol* [Internet]. 2021;Volume 11. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2021.637594>

27. Knöfler M, Pollheimer J. Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Front Genet* [Internet]. 2013;4. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/genetics/articles/10.3389/fgene.2013.00190/full>
28. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* [Internet]. 2004;114(6):744–54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC516273/>
29. Davies JE, Pollheimer J, Yong HEJ, Kokkinos MI, Kalionis B, Knöfle M, Murthi P. Epithelial-mesenchymal transition during extravillous trophoblast differentiation. *Cell Adh Migr* [Internet]. 2016;10(3):310–321. Available from: <https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1170258>
30. Vićovac L, Aplin JD. Epithelial-Mesenchymal Transition during Trophoblast Differentiation. *Acta Anat (Basel)* [Internet]. 1996;156(3):202–16. Available from: <https://doi.org/10.1159/000147847>
31. Harris LK, Jones CJP, Aplin JD. Adhesion Molecules in Human Trophoblast – A Review. II. Extravillous Trophoblast. *Placenta* [Internet]. 2009;30(4):299–304. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.12.003>
32. Cohen M, Bischof P. Factors regulating trophoblast invasion. *Gynecol Obstet Invest* [Internet]. 2007;64(3):126–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17934306/>
33. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* [Internet]. 1991;5(8):2145–54. Available from: </doi/pdf/10.1096/fasebj.5.8.1850705>
34. Stöcker W, Grams F, Reinemer P, Bode W, Baumann U, Gomis-Rüth F-X, McKay DB. The metzincins — Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralyins, and matrixins (collagenases) define a super family of zinc-peptidases. *Protein Sci* [Internet]. 1995;4(5):823–40. Available from: <https://doi.org/10.1002/pro.5560040502>
35. Abdel-Hamid NM, Abass SA. Matrix metalloproteinase contribution in management of cancer proliferation, metastasis and drug targeting. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2021;48(9):6525–38. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06635-z>
36. Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circ Res* [Internet]. 2003;92(8):827–39. Available from: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>
37. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases. *Amino Acids* [Internet]. 2011;41:271–90. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00726-010-0689-x>
38. Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelyny D, Galardy R, Damsky CH, Fisher SJ. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol* [Internet]. 1991;113(2):437–49. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1849141/>

39. Isaka K, Usuda S, Ito H, Sagawa Y, Nakamura H, Nishi H, Suzuki Y, Li YF, Takayama M. Expression and Activity of Matrix Metalloproteinase 2 and 9 in Human Trophoblasts. Placenta [Internet]. 2003;24(1):53–64. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0143400402908672>
40. Bischof P, Martelli M, Campana A, Itoh Y, Ogata Y, Nagase H. Importance of matrix metalloproteinases in human trophoblast invasion. Early Pregnancy [Internet]. 1995;1(4):263–9. Available from: <https://europepmc.org/article/med/9363258>
41. Shimonovitz S, Hurwitz A, Dushnik M, Anteby E, Geva-Eldar T, Yagel S. Developmental regulation of the expression of 72 and 92 kd type IV collagenases in human trophoblasts: A possible mechanism for control of trophoblast invasion. Am J Obstet Gynecol [Internet]. 1994;171(3):832–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0002937894901074>
42. Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. Reprod Biol Endocrinol [Internet]. 2004;2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15294019/>
43. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Dedicated to Professor H. Neurath on the occasion of his 90th birthday. Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol [Internet]. 2000;1477(1):267–83. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167483899002794>
44. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. Cell [Internet]. 2002;110(6):673–87. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6)
45. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. Molecular Biology of the Cell [Internet]. 4th editio. New York: Garland Science; 2002. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26867/>
46. Damsky CH, Librach C, Lim K-H, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. Development [Internet]. 1994;120(12):3657–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7529679/>
47. Cummings RD, Liu F-T, Vasta GR. Galectins. In: Essentials of Glycobiology [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017. p. 625–47. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453091/>
48. Bänfer S, Jacob R. Galectins. Curr Biol [Internet]. 2022;32(9):R406–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.03.065>
49. Houzelstein D, Gonçalves IR, Fadden AJ, Sidhu SS, Cooper DNW, Drickamer K, Leffler H, Poirier F. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. Mol Biol Evol [Internet]. 2004;21(7):1177–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14963092/>
50. Delacour D, Koch A, Jacob R. The Role of Galectins in Protein Trafficking. Traffic [Internet]. 2009;10(10):1405–13. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00960.x>
51. Bänfer S, Jacob R. Galectins in Intra- and Extracellular Vesicles [Internet]. Vol. 10,

Biomolecules. Department of Cell Biology and Cell Pathology, Philipps-Universität Marburg, 35043 Marburg, Germany.; 2020. p. E1232. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/32847140>

52. Popa SJ, Stewart SE, Moreau K. Unconventional secretion of annexins and galectins. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2018;83:42–50. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952117305827>
53. Bidon-Wagner N, Le Pennec JP. Human galectin-8 isoforms and cancer. *Glycoconj J* [Internet]. 2002;19:557–63. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/B:GLYC.0000014086.38343.98>
54. Wada J, Kanwar YS. Identification and Characterization of Galectin-9, a Novel β -Galactoside-binding Mammalian Lectin *. *J Biol Chem* [Internet]. 1997;272(9):6078–86. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.6078>
55. Liu F-T, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2010;1183(1):158–82. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05131.x>
56. Brinchmann MF, Patel DM, Iversen MH. The role of galectins as modulators of metabolism and inflammation. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2018;2018. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2018/9186940>
57. Hirabayashi J, Kasai K. The family of metazoan metal-independent β -galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* [Internet]. 1993;3(4):297–304. Available from: <https://doi.org/10.1093/glycob/3.4.297>
58. Shil RK, Mohammed NBB, Dimitroff CJ. Galectin-9 – ligand axis: an emerging therapeutic target for multiple myeloma. *Front Immunol* [Internet]. 2024;Volume 15. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1469794>
59. Cummings RD, Liu F-T, Rabinovich GA, Stowell SR, Vasta GR. Galectins. In: *Essentials of Glycobiology* [Internet] 4th edition [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. p. 625–47. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579987/>
60. Yang R-Y, Rabinovich GA, Liu F-T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* [Internet]. 2008/06/13. 2008;10:e17. Available from: <https://www.cambridge.org/core/product/D64C5CA9B6A819D490F93C28BC3947EC>
61. Zhang N, Liu Q, Wang D, Wang X, Pan Z, Han B, He G. Multifaceted roles of Galectins: from carbohydrate binding to targeted cancer therapy. *Biomark Res* [Internet]. 2025;13(1):49. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40364-025-00759-1>
62. Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WEG, Yagi F, Kasai K. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2002;1572(2):232–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416502003112>
63. Nio-Kobayashi J. Tissue- and cell-specific localization of galectins, β -galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. *Anat Sci Int* [Internet]. 2017;92(1):25–36. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12565-016-0366-6>

64. Modenutti CP, Capurro JIB, Di Lella S, Martí MA. The Structural Biology of Galectin-Ligand Recognition: Current Advances in Modeling Tools, Protein Engineering, and Inhibitor Design. *Front Chem* [Internet]. 2019;Volume 7-. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/chemistry/articles/10.3389/fchem.2019.00823>
65. Jacob R, Gorek L-S. Intracellular galectin interactions in health and disease. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2024;46(1):4. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00281-024-01010-z>
66. Cummings RD, Liu F-T. Galectins. In: *Essentials of Glycobiology 2nd edition* [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1944/>
67. Bhat R, Belardi B, Mori H, Kuo P, Tam A, Hines WC, Le Q-T, Bertozzi CR, Bissell MJ. Nuclear repartitioning of galectin-1 by an extracellular glycan switch regulates mammary morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2016;113(33):E4820–7. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1609135113>
68. Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, Vasta GR. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol* [Internet]. 2007;17(5):513–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X07001303>
69. Zick Y, Eisenstein M, Goren RA, Hadari YR, Levy Y, Ronen D. Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth. *Glycoconj J* [Internet]. 2002;19(7–9):517–26. Available from: <https://doi.org/10.1023/b:glyc.0000014081.55445.af>
70. Hadari YR, Paz K, Dekel R, Mestrovic T, Accili D, Zick Y. Galectin-8: A NEW RAT LECTIN, RELATED TO GALECTIN-4. *J Biol Chem* [Internet]. 1995;270(7):3447–53. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925818829465/fulltext>
71. Su Z-Z, Lin J, Shen R, Fisher PE, Goldstein NI, Fisher PB. Surface-epitope masking and expression cloning identifies the human prostate carcinoma tumor antigen gene PCTA-1 a member of the galectin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996;93(14):7252–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8692978/>
72. Bidon N, Brichory F, Bourguet P, Le Pennec JP, Dazord L. Galectin-8: a complex sub-family of galectins (Review). *Int J Mol Med* [Internet]. 2001;8(3):245–50. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.8.3.245/abstract>
73. Carlsson S, Öberg CT, Carlsson MC, Sundin A, Nilsson UJ, Smith D, Cummings RD, Almkvist J, Karlsson A, Leffler H. Affinity of galectin-8 and its carbohydrate recognition domains for ligands in solution and at the cell surface. *Glycobiology* [Internet]. 2007;17(6):663–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17339281/>
74. Cárdenas Delgado VM, Nugnes LG, Colombo LL, Troncoso MF, Fernández MM, Malchiodi EL, Frahm I, Croci DO, Compagno D, Rabinovich GA, Wolfenstein-Todel C, Elola MT, Delgado VMC, Nugnes LG, Colombo LL, Troncoso MF, Fernández MM, Malchiodi EL, Frahm I, Croci DO, Compagno D, Rabinovich GA, Wolfenstein-Todel C, Elola MT. Modulation of endothelial cell migration and angiogenesis: a novel function for the “tandem-repeat” lectin galectin-8. *FASEB J • Res Commun* [Internet]. 2011;25(1):242–54. Available from: [/doi/pdf/10.1096/fj.09-144907](https://doi.org/10.1096/fj.09-144907)
75. Troncoso MF, Ferragut F, Bacigalupo ML, Delgado VMC, Nugnes LG, Gentilini L,

- Laderach D, Wolfenstein-Todel C, Compagno D, Rabinovich GA, Elola MT, Cárdenas Delgado VM, Nugnes LG, Gentilini L, Laderach D, Wolfenstein-Todel C, Compagno D, Rabinovich GA, Elola MT, Delgado VMC, Nugnes LG, Gentilini L, Laderach D, Wolfenstein-Todel C, Compagno D, Rabinovich GA, Elola MT. Galectin-8: a matricellular lectin with key roles in angiogenesis. *Glycobiology* [Internet]. 2014;24(10):907–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24939370/>
76. Purić E, Nilsson UJ, Anderluh M. Galectin-8 inhibition and functions in immune response and tumor biology. *Med Res Rev* [Internet]. 2024;44(5):2236–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38613488/>
 77. Elola MT, Ferragut F, Cárdenas Delgado VM, Nugnes LG, Gentilini L, Laderach D, Troncoso MF, Compagno D, Wolfenstein-Todel C, Rabinovich GA. Expression, localization and function of galectin-8, a tandem-repeat lectin, in human tumors. *Histol Histopathol* [Internet]. 2014;29(9):1093–105. Available from: <https://doi.org/10.14670/hh-29.1093>
 78. Metz C, Döger R, Riquelme E, Cortés P, Holmes C, Shaughnessy R, Oyanadel C, Grabowski C, González A, Soza A. Galectin-8 promotes migration and proliferation and prevents apoptosis in U87 glioblastoma cells. *Biol Res* [Internet]. 2016;49(33):1–10. Available from: <https://biolres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40659-016-0091-6>
 79. Thurston TLM, Wandel MP, von Muhlinen N, Foeglein Á, Randow F. Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* [Internet]. 2012;482(7385):414–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature10744>
 80. Hadari YR, Arbel-Goren R, Levy Y, Amsterdam A, Alon R, Zakut R, Zick Y. Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J Cell Sci* [Internet]. 2000;113 (Pt 1(13):2385–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10852818/>
 81. Levy Y, Arbel-Goren R, Hadari YR, Eshhar S, Ronen D, Elhanany E, Geiger B, Zick Y. Galectin-8 Functions as a Matricellular Modulator of Cell Adhesion. *J Biol Chem* [Internet]. 2001;276(33):31285–95. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820802853/fulltext>
 82. Zick Y. Galectin-8, cytokines, and the storm. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2022;50:135–49. Available from: <https://doi.org/10.1042/BST20200677>
 83. Chien Y-C, Wu J-Y, Pang C-C, Chou R-H, Yu Y-L. The clinical impact of galectin-8 in drug resistant breast cancer. *J Cancer* [Internet]. 2025;16(4):1296–309. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11786030/>
 84. Troncoso MF, Elola MT, Blidner AG, Sarrias L, Espelt M V., Rabinovich GA. The Universe of Galectin-Binding Partners and Their Functions in Health and Disease. *J Biol Chem* [Internet]. 2023;299(12):105400. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37898403/>
 85. Nishi N, Shoji H, Seki M, Itoh A, Miyanaka H, Yuube K, Hirashima M, Nakamura T. Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin α M. *Glycobiology* [Internet]. 2003;13(11):755–63. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwg102>
 86. Cárcamo C, Pardo E, Oyanadel C, Bravo-Zehnder M, Bull P, Cáceres M, Martínez J, Massardo L, Jacobelli S, González A, Soza A. Galectin-8 binds specific β 1 integrins and induces polarized spreading highlighted by asymmetric lamellipodia in Jurkat T cells. *Exp*

Cell Res [Internet]. 2006;312(4):374–86. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.10.025>

87. Vicuña L, Pardo E, Curkovic C, Döger R, Oyanadel C, Metz C, Massardo L, González A, Soza A. Galectin-8 binds to LFA-1, blocks its interaction with ICAM-1 and is counteracted by anti-Gal-8 autoantibodies isolated from lupus patients. *Biol Res* [Internet]. 2013;46(3):275–80. Available from:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-97602013000300008&lng=en&nrm=iso&tlng=en
88. Romaniuk MA, Tribulatti MV, Cattaneo V, Laponi MJ, Molinas FC, Campetella O, Schattner M. Human platelets express and are activated by galectin-8. *Biochem J* [Internet]. 2010;432(3):535–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20858220/>
89. Oyanadel C, Holmes C, Pardo E, Retamal C, Shaughnessy R, Smith P, Cortés P, Bravo-Zehnder M, Metz C, Feuerhake T, Romero D, Roa JC, Montecinos V, Soza A, González A. Galectin-8 induces partial epithelial–mesenchymal transition with invasive tumorigenic capabilities involving a FAK/EGFR/proteasome pathway in Madin–Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2018;29(5):557–74. Available from:
<https://doi.org/10.1091/mbc.E16-05-0301>
90. Gourdine J-PF, Nava P, Noll AJ, Duong DM, Seyfried NT, Cummings RD. CD45 and Basigin (CD147) Are Functional Ligands for Galectin-8 on Human Leukocytes [Internet]. Vol. 15, *Biomolecules*. 2025. p. 1243. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/15/9/1243>
91. Kolundžić N, Bojić-Trbojević Ž, Radojčić L, Petronijević M, Vićovac L. Galectin-8 is expressed by villous and extravillous trophoblast of the human placenta. *Placenta* [Internet]. 2011;32(11):909–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.07.087>
92. Blois SM, Verlohren S, Wu G, Clark G, Dell A, Haslam SM, Barrientos G. Role of galectin-glycan circuits in reproduction: from healthy pregnancy to preterm birth (PTB). *Semin Immunopathol* 2020 424 [Internet]. 2020;42(4):469–86. Available from:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-020-00801-4>
93. Blois SM, Barrientos G. Galectin signature in normal pregnancy and preeclampsia. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2014;101–102(1):127–34. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.jri.2013.05.005>
94. Jeschke U, Mayr D, Schiessl B, Mylonas I, Schulze S, Kuhn C, Friese K, Walzel H. Expression of Galectin-1, -3 (gal-1, gal-3) and the Thomsen–Friedenreich (TF) Antigen in Normal, IUGR, Preeclamptic and HELLP Placentas. *Placenta* [Internet]. 2007;28(11–12):1165–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.06.006>
95. Karrar SA, Martingano DJ, Hong PL. Preeclampsia. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570611/>
96. Poon LC, Shennan A, Hyett JA, Kapur A, Hadar E, Divakar H, McAuliffe F, da Silva Costa F, von Dadelszen P, McIntyre HD, Kihara AB, Di Renzo GC, Romero R, D’Alton M, Berghella V, Nicolaides KH, Hod M. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Initiative on Preeclampsia (PE): A Pragmatic Guide for First Trimester Screening and Prevention. *Int J Gynaecol Obstet* [Internet]. 2019;145(Suppl 1):1–33.

Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6944283/>

97. Rana S, Lemoine E, Granger JP, Karumanchi SA. Preeclampsia. *Circ Res* [Internet]. 2019;124(7):1094–112. Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313276>
98. Duley L. The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. *Semin Perinatol* [Internet]. 2009;33(3):130–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0146000509000214>
99. Goldman-Wohl D, Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2002;187(1):233–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720701006876>
100. Staff AC, Fjeldstad HE, Fosheim IK, Moe K, Turowski G, Johnsen GM, Alnaes-Katjavivi P, Sugulle M. Failure of physiological transformation and spiral artery atherosclerosis: their roles in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2022;226(2):S895–906. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.09.026>
101. Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M. The Uterine Spiral Arteries In Human Pregnancy: Facts and Controversies. *Placenta* [Internet]. 2006;27(9–10):939–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16490251/>
102. Menkhorst E, Winship A, Van Sinderen M, Dimitriadis E. Human extravillous trophoblast invasion: intrinsic and extrinsic regulation. *Reprod Fertil Dev* [Internet]. 2014;28(4):406–15. Available from: <https://doi.org/10.1071/RD14208>
103. Ghorbanpour SM, Richards C, Pienaar D, Sesperez K, Aboukheyr Es. H, Nikolic VN, Karadzov Orlic N, Mikovic Z, Stefanovic M, Cakic Z, Alqudah A, Cole L, Gorrie C, McGrath K, Kavurma MM, Ebrahimi Warkiani M, McClements L. A placenta-on-a-chip model to determine the regulation of FKBPL and galectin-3 in preeclampsia. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2023;80(2):44. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04648-w>
104. Sammar M, Drobnjak T, Mandala M, Gizurarson S, Huppertz B, Meiri H. Galectin 13 (PP13) facilitates remodeling and structural stabilization of maternal vessels during pregnancy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13).
105. Gadde Ranjeeta, CD Dayanand, Sheela SR. Placental protein 13: An important biological protein in preeclampsia. *J Circ Biomarkers* [Internet]. 2018;7:1849454418786159. Available from: <https://doi.org/10.1177/1849454418786159>
106. Wang M, Xu YY, Wang P, Xu YY, Jin P, Wu Z, Qian Y, Bai L, Dong M. Galectin-14 Promotes Trophoblast Migration and Invasion by Upregulating the Expression of MMP-9 and N-Cadherin. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2021;9:645658. Available from: www.frontiersin.org
107. Kolundžić N, Bojić-Trbojević Ž, Kovačević T, Stefanoska I, Kadoya T, Vićovac L. Galectin-1 is part of human trophoblast invasion machinery - A functional study in vitro. *PLoS One* [Internet]. 2011;6(12):e28514. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028514>
108. Bojić-Trbojević Ž, Jovanović Krivokuća M, Vilotić A, Kolundžić N, Stefanoska I, Zetterberg F, Nilsson UJ, Leffler H, Vićovac L. Human trophoblast requires galectin-3 for cell migration and invasion. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):2136. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38374-w>

109. Seckl MJ, Sebire NJ, Berkowitz RS. Gestational trophoblastic disease. *Lancet* [Internet]. 2010;376(9742):717–29. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673610602802>
110. Dragusin CR, Șorop-Florea M, Pătru LC, Zorila L, Marinaș C, Sorop BV, Capitanescu R, Iliescu DG. Abnormalities of the Placenta. In: Tudorache S, editor. *Congenital Anomalies - From the Embryo to the Neonate* [Internet]. London: IntechOpen; 2018. Available from: <https://doi.org/10.5772/intechopen.75985>
111. Candelier J-J. The hydatidiform mole. *Cell Adh Migr* [Internet]. 2016;10(1–2):226–35. Available from: <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1093275>
112. Hui P, Buza N, Murphy KM, Ronnett BM. Hydatidiform Moles: Genetic Basis and Precision Diagnosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2017;12(Volume 12, 2017):449–85. Available from: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-pathol-052016-100237>
113. Green CL, Angtuaco TL, Shah HR, Parmley TH. Gestational trophoblastic disease: a spectrum of radiologic diagnosis. *Radiographics* [Internet]. 1996;16(6):1371–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8946542/>
114. El-agwany AS, Abdeldayem TM. Invasive mole of the uterus: A description of two cases managed by hysterectomy. *Egypt J Radiol Nucl Med* [Internet]. 2015;46(4):1267–70. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378603X15001370>
115. Yousefi Z, Mottaghi M, Rezaei A, Ghasemian S. Abnormal Presentation of Choriocarcinoma and Literature Review. *Iran J Cancer Prev* [Internet]. 2016;9(2):e4389. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4951767/>
116. Mangla M, Palo S, Kanikaram P, Kaur H. Non-gestational choriocarcinoma: unraveling the similarities and distinctions from its gestational counterpart. *Int J Gynecol Cancer* [Internet]. 2024;34(6):926–34. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1048891X2401404X>
117. Božić M, Petronijević M, Milenković S, Atanacković J, Lazić J, Vićovac L. Galectin-1 and galectin-3 in the trophoblast of the gestational trophoblastic disease. *Placenta* [Internet]. 2004;25(10):797–802. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.03.006>
118. Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, Macdougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK. Establishment and Characterization of First Trimester Human Trophoblast Cells with Extended Lifespan. *Exp Cell Res*. 1993;206(2):204–11.
119. Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent [Internet]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/13778030>
120. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* [Internet]. 1983;65(1):55–63. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175983903034>
121. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay [Internet]. Vol. 2018, Cold Spring Harbor protocols. 2018. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/29858338>
122. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time

- quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* [Internet]. 2001;25(4):402–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/>
123. Abcam. Stripping for reprobing [Internet]. Available from: <https://docs.abcam.com/pdf/protocols/western-blot-membrane-stripping-for-restaining-protocol.pdf>
 124. Stevanović J, Robajac D, Nedić O, Dobrijević Z. Post-TRIzol protein extraction from peripheral blood mononuclear cells. *J Serbian Chem Soc*. 2023;88(7–8):729–38.
 125. Bruić M, Pirković A, Vilotić A, Jovanović-Krivokuća M, Spremo-Potparević B. Cytoprotective and genoprotective effects of taxifolin against oxidative damage in HTR-8/SVneo human trophoblast cells. *Mutagenesis* [Internet]. 2023;38(1):64–70. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/mutage/geac013>
 126. Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res Mol Mech Mutagen*. 1994;307(1):261–71.
 127. Heino J. Cellular Signaling by Collagen-Binding Integrins BT - I Domain Integrins. In: Gullberg D, editor. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014. p. 143–55. Available from: https://doi.org/10.1007/978-94-017-9153-3_10
 128. Camby I, Belot N, Rorive S, Lefranc F, Maurage C-AA, Lahm H, Kaltner H, Hadari Y, Ruchoux MM, Brotchi J, Zick E, Salmon I, Gabius H-JJ, Kiss R. Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration. *Brain Pathol* [Internet]. 2001;11(1):12–26. Available from: </pmc/articles/PMC8098336/>
 129. Cueni LN, Detmar M. Galectin-8 interacts with podoplanin and modulates lymphatic endothelial cell functions. *Exp Cell Res* [Internet]. 2009;315(10):1715–23. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482709000834>
 130. Labrie M, De Araujo LOF, Communal L, Mes-Masson AM, St-Pierre Y. Tissue and plasma levels of galectins in patients with high grade serous ovarian carcinoma as new predictive biomarkers. *Sci Reports* 2017 71 [Internet]. 2017;7(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-13802-5>
 131. Yu TB, Dodd S, Yu LG, Subramanian S. Serum galectins as potential biomarkers of inflammatory bowel diseases. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6957193/>
 132. Lo Y-H, Li C-S, Chen H-L, Chiang C-Y, Huang C-C, Tu T-J, Lo T-H, Choy DF, Arron JR, Chen H-Y, Liu F-T. Galectin-8 Is Upregulated in Keratinocytes by IL-17A and Promotes Proliferation by Regulating Mitosis in Psoriasis. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2021;141(3):503–511.e9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32805218/>
 133. Arbel-Goren R, Levy Y, Ronen D, Zick Y. Cyclin-dependent kinase inhibitors and JNK act as molecular switches, regulating the choice between growth arrest and apoptosis induced by galectin-8. *J Biol Chem* [Internet]. 2005;280(19):19105–14. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820675603/fulltext>
 134. Jacks T, Weinberg RA. The Expanding Role of Cell Cycle Regulators. *Science* (80-)

[Internet]. 1998;280(5366):1035–6. Available from:
<https://www.science.org/doi/10.1126/science.280.5366.1035>

135. Carvalho RS, Fernandes VC, Nepomuceno TC, Rodrigues DC, Woods NT, Suarez-Kurtz G, Chammas R, Monteiro AN, Carvalho MA. Characterization of LGALS3 (galectin-3) as a player in DNA damage response. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2014;15(7):840–50. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cbt.28873>
136. Lautenschlaeger T, Patel D, El-Jawahri A, Palanichamy K, Chakravarti A. The Role of Galectins in Mediating Resistance to Radiotherapy in Glioma. *Int J Radiat Oncol* [Internet]. 2009;75(3):S562–3. Available from: <http://www.redjournal.org/article/S036030160902327X/fulltext>
137. Boutas I, Potiris A, Brenner W, Lebrecht A, Hasenburg A, Kalantaridou S, Schmidt M. The expression of galectin-3 in breast cancer and its association with chemoresistance: a systematic review of the literature. *Arch Gynecol Obstet* [Internet]. 2019;300(5):1113–20. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00404-019-05292-9>
138. Friedel M, André S, Goldschmidt H, Gabius HJ, Schwartz-Albiez R. Galectin-8 enhances adhesion of multiple myeloma cells to vascular endothelium and is an adverse prognostic factor. *Glycobiology* [Internet]. 2016;26(10):1048–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27287437/>
139. Diskin S, Chen W-SS, Cao Z, Gyawali S, Gong H, Soza A, González A, Panjwani N. Galectin-8 Promotes Cytoskeletal Rearrangement in Trabecular Meshwork Cells through Activation of Rho Signaling. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(9):e44400. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22973445/>
140. VARINSKÁ L, FÁBER L, PETROVOVÁ E, BALÁŽOVÁ L, IVANČOVÁ E, KOLÁŘ M, GÁL P. Galectin-8 Favors VEGF-Induced Angiogenesis: In Vitro Study in Human Umbilical Vein Endothelial Cells and In Vivo Study in Chick Chorioallantoic Membrane. *Anticancer Res* [Internet]. 2020;40(6):3191–201. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32487613/>
141. Nagy N, Bronckart Y, Camby I, Legendre H, Lahm H, Kaltner H, Hadari Y, P VH, Yeaton P, Pector J-C, Zick Y, Salmon I, Danguy A, Kiss R, Gabius H-JJ, Van Ham P, Yector JC, Zeaton P, Pick Y, Salmon I, Danguy A, Kiss R, Gabius H-JJ. Galectin-8 expression decreases in cancer compared with normal and dysplastic human colon tissue and acts significantly on human colon cancer cell migration as a suppressor. *Gut* [Internet]. 2002;50(3):392–401. Available from: <https://doi.org/10.1136/gut.50.3.392>
142. Čujić D, Kosanović M, Jovanović Krivokuća M, Vićovac L, Janković M. Extracellular presence/release of galectins from HTR-8/SVneo extravillous trophoblast cells*. *Turkish J Biol* [Internet]. 2017;41(5):843–8. Available from: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol41/iss5/15>
143. Xu B, Shanmugalingam R, Chau K, Makris A, Hennessy A. Galectin-1–Related Modulation of Trophoblast Endothelial Interactions by Integrins $\alpha 1$ and $\beta 1$. *Reprod Sci* [Internet]. 2020;27(5):1097–109. Available from: <https://doi.org/10.1007/s43032-019-00046-z>
144. Bojić-Trbojević Ž, Jovanović Krivokuća M, Stefanoska I, Kolundžić N, Vilotić A, Kadoya T, Vićovac L. Integrin $\beta 1$ is bound to galectin-1 in human trophoblast. *J Biochem* [Internet]. 2018;163(1):39–50. Available from: <https://doi.org/10.1093/JB/MVX061>

145. Nikolov A, Popovski N. Role of Gelatinases MMP-2 and MMP-9 in Healthy and Complicated Pregnancy and Their Future Potential as Preeclampsia Biomarkers. *Diagnostics* [Internet]. 2021;11(3). Available from: [/pmc/articles/PMC8001076/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38001076/)
146. Oravec O, Xie Y, Balogh A, Posta M, Harms C, Farkas E, Borowski S, Szekeres-Barthó J, Than NG, Blois SM. Maternal and placental galectins: key players in the fetomaternal symbiotic tango. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2025;47(1):35. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00281-025-01061-w>
147. Than NG, Romero R, Balogh A, Karpati E, Mastrolia SA, Staretz-Chacham O, Hahn S, Erez O, Papp Z, Kim CJ. Galectins: Double-edged Swords in the Cross-roads of Pregnancy Complications and Female Reproductive Tract Inflammation and Neoplasia. *jptm* [Internet]. 2015;49(3):181–208. Available from: <http://dx.doi.org/10.4132/jptm.2015.02.25>
148. Liu F-T, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2005;5(1):29–41. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrc1527>
149. Xie Y, Wang X, Wang W, Pu N, Liu L. Epithelial-mesenchymal transition orchestrates tumor microenvironment: current perceptions and challenges. *J Transl Med* [Internet]. 2025;23(1):386. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12967-025-06422-5>
150. Satelli A, Rao PS, Gupta PK, Lockman PR, Srivenugopal KS, Rao US. Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines. *Oncol Rep* [Internet]. 2008;19(3):587–94. Available from: <https://doi.org/10.3892/or.19.3.587>
151. Bidon N, Brichory F, Hanash S, Bourguet P, Dazord L, Le Pennec JP. Two messenger RNAs and five isoforms for Po66-CBP, a galectin-8 homolog in a human lung carcinoma cell line. *Gene* [Internet]. 2001;274(1–2):253–62. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00598-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00598-4)
152. Roy M, Nguimbus LM, Badiane PY, Goguen-Couture V, Degrandmaison J, Parent JL, Brunet MA, Roux S. Galectin-8 modulates human osteoclast activity partly through isoform-specific interactions. *Life Sci Alliance* [Internet]. 2024;7(5). Available from: <https://doi.org/10.26508/LSA.202302348>
153. Ingrassia L, Camby I, Lefranc F, Mathieu V, Nshimyumukiza P, Darro F, Kiss R. Anti-galectin compounds as potential anti-cancer drugs. *Curr Med Chem* [Internet]. 2006;13(29):3513–27. Available from: <https://doi.org/10.2174/092986706779026219>
154. Stowell SR, Arthur CM, Slanina KA, Horton JR, Smith DF, Cummings RD. Dimeric galectin-8 induces phosphatidylserine exposure in leukocytes through polylectosamine recognition by the C-terminal domain. *J Biol Chem* [Internet]. 2008;283(29):20547–59. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820597068/fulltext>
155. Weinmann D, Kenn M, Schmidt S, Schmidt K, Walzer SM, Kubista B, Windhager R, Schreiner W, Toegel S, Gabius H-J. Galectin-8 induces functional disease markers in human osteoarthritis and cooperates with galectins-1 and -3. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2018;75(22):4187–205. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2856-2>
156. Eshkar Sebban L, Ronen D, Levartovsky D, Elkayam O, Caspi D, Aamar S, Amital H, Rubinow A, Golan I, Naor D, Zick Y, Golan I. The Involvement of CD44 and Its Novel Ligand Galectin-8 in Apoptotic Regulation of Autoimmune Inflammation. *J Immunol* [Internet]. 2007;179(2):1225–35. Available from:

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.1225>

157. Than NG, Erez O, Wildman DE, Tarca AL, Edwin SS, Abbas A, Hotra J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan SS, Espinoza J, Papp Z, Romero R. Severe preeclampsia is characterized by increased placental expression of galectin-1. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2008;21(7):429–42. Available from: <https://doi.org/10.1080/14767050802041961>
158. Alese OM, Moodley J, Naicker T. The role of Galectin-1 in HIV associated preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2020;246:138–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301211520300336>
159. Freitag N, Tirado-González I, Barrientos G, Herse F, Thijssen VLJL, Weedon-Fekjær SM, Schulz H, Wallukat G, Klapp BF, Nevers T, Sharma S, Staff AC, Dechend R, Blois SM. Interfering with Gal-1–mediated angiogenesis contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013;110(28):11451–6. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1303707110>
160. Molvarec A, Blois SM, Stenczer B, Toldi G, Tirado-Gonzalez I, Ito M, Shima T, Yoneda S, Vászárhelyi B, Rigó J, Saito S. Peripheral blood galectin-1-expressing T and natural killer cells in normal pregnancy and preeclampsia. *Clin Immunol* [Internet]. 2011;139(1):48–56. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521661610008107>
161. Hirashima C, Ohkuchi A, Nagayama S, Suzuki H, Takahashi K, Ogoyama M, Takahashi H, Shirasuna K, Matsubara S. Galectin-1 as a novel risk factor for both gestational hypertension and preeclampsia, specifically its expression at a low level in the second trimester and a high level after onset. *Hypertens Res* [Internet]. 2018;41(1):45–52. Available from: <https://doi.org/10.1038/hr.2017.85>
162. Hutter S, Martin N, von Schönfeldt V, Messner J, Kuhn C, Hofmann S, Andergassen U, Knabl J, Jeschke U. Galectin 2 (gal-2) expression is downregulated on protein and mRNA level in placentas of preeclamptic (PE) patients. *Placenta* [Internet]. 2015;36(4):438–45. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400415002428>
163. Ruikar K, Aithal M, Shetty P, Dinesh US, Bargale A, Sadashiv R, Sarathkumar E, Khode V, Desai R, Patil P. Placental Expression and Relative Role of Anti-inflammatory Annexin A1 and Animal Lectin Galectin-3 in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Indian J Clin Biochem* [Internet]. 2022;37(1):60–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12291-020-00952-z>
164. Pankiewicz K, Szczerba E, Fijalkowska A, Szamotulska K, Szewczyk G, Issat T, Maciejewski TM. The association between serum galectin-3 level and its placental production in patients with preeclampsia. *J Physiol Pharmacol* [Internet]. 2020;71(6):845–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33727431/>
165. Sattar Taha A, Zahraei Z, Al-Hakeim HK. Serum apelin and galectin-3 in preeclampsia in Iraq. *Hypertens Pregnancy* [Internet]. 2020;39(4):379–86. Available from: <https://doi.org/10.1080/10641955.2020.1777300>
166. Kandel M, Tong S, Walker SP, Cannon P, Nguyen T-V, MacDonald TM, Hannan NJ, Kaitu'u-Lino TJ, Bartho LA. Placental galectin-3 is reduced in early-onset preeclampsia. *Front Physiol* [Internet]. 2022;Volume 13. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2022.1037597>
167. Menkhorst E, Koga K, Van Sinderen M, Dimitriadis E. Galectin-7 serum levels are altered

prior to the onset of pre-eclampsia. *Placenta* [Internet]. 2014;35(4):281–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400414000307>

168. Miko E, Meggyes M, Bogar B, Schmitz N, Barakonyi A, Varnagy A, Farkas B, Tamas P, Bodis J, Szekeres-Bartho J, Illes Z, Szereday L. Involvement of Galectin-9/TIM-3 Pathway in the Systemic Inflammatory Response in Early-Onset Preeclampsia. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(8):e71811. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0071811>
169. Than NG, Abdul Rahman O, Magenheimer R, Nagy B, Fule T, Hargitai B, Sammar M, Hupuczi P, Tarca AL, Szabo G, Kovalszky I, Meiri H, Sziller I, Rigo Jr. J, Romero R, Papp Z. Placental protein 13 (galectin-13) has decreased placental expression but increased shedding and maternal serum concentrations in patients presenting with preterm pre-eclampsia and HELLP syndrome. *Virchows Arch* [Internet]. 2008;453(4):387–400. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00428-008-0658-x>
170. Sammar M, Nisemblat S, Fleischfarb Z, Golan A, Sadan O, Meiri H, Huppertz B, Gonen R. Placenta-bound and Body Fluid PP13 and its mRNA in Normal Pregnancy Compared to Preeclampsia, HELLP and Preterm Delivery. *Placenta* [Internet]. 2011;32:S30–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400410003516>
171. Karadzov Orlic N, Joksić I. Preeclampsia pathogenesis and prediction - where are we now: the focus on the role of galectins and miRNAs. *Hypertens Pregnancy* [Internet]. 2025;44(1):2470626. Available from: <https://doi.org/10.1080/10641955.2025.2470626>

Biografija

Janko B. Legner rođen je 03.02.1984. godine u Ljubljani. Osnovnu školu je pohađao u Beogradu i na Novom Zelandu, gde je završio i srednju školu. Osnovne (*Bachelor*) akademske studije u oblasti medicinskih laboratorijskih nauka završio je 2006. godine na Mesi Univerzitetu na Novom Zelandu. Nakon toga je radio u medicinskim laboratorijama, uglavnom u oblasti hematologije, na Novom Zelandu. Master akademske studije u oblasti medicinskih laboratorijskih nauka završio je 2016. godine na Mesi Univerzitetu na Novom Zelandu. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Genetika, upisao je 2019. godine. Od marta 2020. godine zaposlen je u Institutu za primenu nuklearne energije, Univerziteta u Beogradu, na Odeljenju za biologiju reprodukcije, gde je uradio eksperimentalni deo svoje doktorske disertacije. Bavi se ispitivanjem značaja galektina-8 u procesima rane trudnoće i njegovih mogućih implikacija u patologijama povezanim sa funkcijom trofoblasta, kao i analizom uticaja različitih jedinjenja i proteina na funkciju trofoblasta.

Član je Sprskog biološkog društva od 2022. godine. Do sada je objavio četiri rada u međunarodnim časopisima. Imao je i šest saopštenja na nacionalnim i međunarodnim naučnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани **Јанко Легнер**

број индекса **Б3037/2019**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Значај галектина-8 за процес плацентације и његова експресија у ћелијама хориокарцинома и ткиву плаценти пацијенткиња са прееклампсијом

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Јанко Легнер**

Број индекса **Б3037/2019**

Студијски програм **Биологија, модул: Генетика**

Наслов рада **Значај галектина-8 за процес плацентације и његова експресија у
ћелијама хориокарцинома и ткиву плаценти пацијенткиња са
пreekлампсијом**

Ментори **др Милица Јовановић Кривокућа**, научни саветник
др Милица Маркелић, ванредни професор

Потписани **Јанко Легнер**

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Значај галектина-8 за процес плацентације и његова експресија у ћелијама хориокарцинома и ткиву плаценти пацијенткиња са прееклампсијом

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

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