

Značenje nalaza DNA humanih papiloma virusa u patohistološkom materijalu spontanih pobačaja s aneuploidijom u roditelja s urednim konstitucijskim kariotipom

Čulić, Vida

Doctoral thesis / Disertacija

2008

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:680790>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

VIDA ČULIĆ

**ZNAČENJE NALAZA DNA HUMANIH PAPILOMA VIRUSA U PATOHISTOLOŠKOM
MATERIJALU SPONTANIH POBAČAJA S ANEUPLOIDIJOM U RODITELJA S
UREDNIH KONSTITUCIJSKIM KARIOTIPOM**

Doktorska disertacija

Split, 2008.

Rad je izrađen u Laboratoriju za humanu genetiku, Odsjeka za medicinsku genetiku s laboratorijem za humanu genetiku i genetskim savjetovalištem, Klinike za dječje bolesti KBC Split te u Laboratoriju za molekulsku patologiju KBC Šalata, Zagreb i Zavodu za patologiju i sudsku medicinu i citologiju KBC Split.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Dragan Primorac, dr. med.

Posebno zahvaljujem djelatnicama Odsjeka za medicinsku genetiku i Laboratorija za humanu genetiku, Klinike za dječje bolesti, djelatnicima Laboratorija za molekulsku genetiku KBC Šalata, Zagreb, djelatnicima i kolegama Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split a posebno Doc. dr. sc. Ireni Drmić i Prof. dr. sc. Ivani Kuzmić, studentima medicine Silvani Mišković, Žani Žegarac i Goranu Mijaljici, kao i svim kolegama koji su mi pomogli svojim savjetima. Posebnu zahvalnost iskazujem donatorima na materijalnoj pomoći pri realizaciji ovog projekta.

Zahvaljujem dr. sc. Goranu kardumu (Medicinski fakultet Split), Josipu Arneriću dipl. oec. (Ekonomski fakultet Split) i mr. sc. Pašku Konjevodi (Institut Ruđer Bošković, Zagreb) za pomoć pri statističkoj obradi podataka

Posebno se zahvaljujem prof. dr. sc. Jasminki Pavelić (Institut Ruđer Bošković, Zagreb) za pomoć, ljubav i strpljenje tijekom izrade ovog rada.

Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji (suprugu i sinovima, majci i ocu) koja je bila, i koja je stalno, moja potpora i nadahnuće.

Moto

«ricerca, ricerca, ricerca»

«istraživanje, istraživanje, istraživanje»

prof. dr. sc. Andrea Biondi, pedijatar, subspec. hematolog, molekularni genetičar Monza, Italija

SADRŽAJ

POPIS KRATICA	4
1. UVOD	8
1. 1. KROMOSOMI	8
1. 2. ZAMETAK I TRUDNOĆA	13
1. 3. TERATOGENI	22
1. 3. 1. INFEKCIJSKI AGENSI	24
1. 3. 1. 1. VIRUSI	25
1. 3. 1. 1. 1. CITOMEGALOVIRUS (CMV)	27
1. 3. 1. 1. 2. EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV)	29
1. 3. 1. 1. 3. HUMANI PAPILOMAVIRUSI (HPV)	31
1. 4. POSTELJICA	35
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	38
3. ISPITANICI I POSTUPCI	40
3. 1. ISPITANICI	40
3. 2. POSTUPCI	41
3. 2. 1. Informacijski razgovor	41
3. 2. 2. Kariotipizacija – GTG-analiza kromosoma	42
3. 2. 3. Ispitivanje sadržaja DNA u patohistološkom materijalu spontanog pobačaja metodom protočne citometrije	45
3. 2. 4. Izolacija DNA iz parafinskih rezova tkiva	48
3. 2. 5. Metoda lančane reakcije polimerazom – PCR	49
3. 2. 6. Hibridizacija <i>in situ</i>	50
3. 2. 7. Statistička obrada podataka	51
4. POŠTIVANJE ETIČKIH NAČELA ISTRAŽIVANJA	52
5. REZULTATI	53
6. RASPRAVA	79
7. ZAKLJUČCI	102
8. SAŽETAK	104
9. SUMMARY	105
10. LITERATURA	106
11. ŽIVOTOPIS	129

POPIS KRATICA

AAV – adeno združeni virus (od engl. *adeno-associated virus*)

ATP – adenzin trifosfat

EBV-a

CD4/CD8 – podvrsta limfocita T

CGH – komparativna genomska hibridizacija (od engl. *comparative genomic hybridization*)

CIN – cervikalna intraepitelna neoplazija

CMV – citomegalovirus

CPI/CPII G – konsenzus početnice za dokazivanje HPV reakcijom PCR

CV – koeficijent varijacije

CVH – hemoragija korionskih resica (od engl. *chorionic villous hemorrhage*)

DAB – diaminobenzidin

dNTP – deoksinukleotidi

DI – DNA indeks

DOP – degenerirane oligonukleotidne početnice za metodu DOP-PCR (od engl. *degenerate oligonucleotide primers*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (od engl. *deoxyribonucleic acid*)

E – rano (od engl. *early*)

EA/D – rani antigeni/difuzni (od engl. *early antigens-diffuse*)

EA/R – rani antigeni/ograničeni (od engl. *early antigens-restricted*)

EBV – Epstein Barr-ov virus

EHGS – Europsko udruženje za humanu genetiku (od engl. *European Human Genetic Society*)

EBNA – antigeni jezgre 1-6

ECA – Europsko udruženje za citogenetiku (od engl. *European Cytogenetic Association*)

EDTA – antikoagulans (od engl. *ethylene diamine tetraacetic acid*)

ELISA – serološka metoda (od engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

FAAH – enzim koji razgrađuje anandamid (od engl. *fatty acid amide hydrolase*)

FISH – fluorescentna hibridizacija *in situ* (od engl. *fluorescent in situ hybridization*)

G1 – faza staničnog ciklusa (od engl. *gap* – praznina)

G2 – faza staničnog ciklusa (od engl. *gap* – praznina)

Gp5/6 – konsenzus početnice za dokazivanje HPV metodom PCR

GTG – giemsa-tripsin-giemsa (metoda pruganja kromosoma)

HCG – humani korionski gonadotropin (od engl. *human chorionic gonadotropin*)

HEPES – puferirana fiziološka optopina (od engl. *N-2-hydroxyethylpiperazine-propanesulfonic acid*)

HHV – humani herpes virus (od engl. *human herpes virus*)

HIV – virus humane imunodeficijencije (od engl. *human immunodeficiency virus*)

HLA – humani leukocitni antigen (od engl. *human leukocyte antigen*)

HM – hidatiformna mola (od engl. *hydatiform mole*)

HP1 – protein heterokromatina

HPV – humani papilomavirus (od engl. *human papilomavirus*)

HPVpU – početnica za umnožavanje zloćudnih tipova HPV-a

HPV-TM – kontrolni templat za umnožavanje zloćudnih tipova HPV-a metodom PCR

HV – Hrvatska vojska

ICSI – intracitoplazmatska spermalna injekcija (od engl. *intracytoplasmic sperm injection*)

Idiogram-shematski prikaz kariograma

IgM – imunoglobulini klase M

IgG – imunoglobulini klase G

IFN- α – interferon alfa

IUZR – intrauterini zastoj rasta

IVF – *in vitro* fertilizacija

Kariotip-kromosomska karta pojedinca

L – kasno (od engl. *late*)

LAK – stanice (od engl. *lymphokines active killer cells*)

LMP – «latentni» membranski protein (od engl. *latent membrane protein*)

M – mitozna (faza staničnog ciklusa)

MHC – glavni sustav tkivne prepoznatljivosti (od engl. *major histocompatibility complex*)

MORH – Ministarstvo obrane Republike Hrvatske

MTHFR – gen/protein (od engl. *methylene tetrahydrofolate reductase*)

My09/My11 – konsenzus početnice za dokazivanje HPV-a metodom PCR

NTD – defekt neuralne cijevi (od engl. *neural tube defect*)

ORF – otvoreni okvir čitanja (od engl. *open reading frame*)

pB – parovi baza

PBS – fosfatni pufer (od engl. *phosphate buffered saline*)

Peg3 – gen/protein

PC04 i GH20 – početnice za globin

PCR – lančana reakcija polimerazom (od engl. *polymerase chain reaction*)

PGD – preimplantacijska genetska dijagnoza

PHA – fitohemaglutinin (engl. *phytohaemagglutinine*)

PVC – polivinil klorid (od engl. *polyvinil chloride*)

p53 – gen/protein 53

R – regulacijski (engl. *regulatory*)

RB – retinoblastom

RFLP – polimorfizam određivanjem duljine restrikcijskih ulomaka (od engl. *restriction fragment length polymorphism*)

RNA – ribonukleinska kiselina (od engl. *ribonucleic acid*)

RSV – respiracijski sincicijski virus

RT-PCR – metoda (od engl. *real-time PCR*)

SCC – karcinom pločastih stanica (engl. *squamous cell carcinoma*)

SSC – otopina natrij klorida i natrij borata (od engl. *sodium chloride and sodium citrate*)

SIOP – Internacionalno društvo za pedijatrijsku onkologiju (od engl. *Society of International Oncology Paediatric*)

S – sinteza (faza staničnog ciklusa)

SSS – srednja stručna sprema

STD – spolno prenosive bolesti (od engl. *sexually transmitted diseases*)

Taq – enzim izoliran iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*

TBE – tris/borat/EDTA otopina

TaKaRa – Biotehnološka kompanija

TK – tirozin kinaza

TNF – čimbenik nekroze tumora (od engl. *tumor necrosis factor*)

TORCH – toksoplazma, rubeola, citomegalovirus, herpes

UPD – uniparentalna disomija

VSS – visoka stručna sprema

VCA – virus kapsidni antigen

ZEBRA – Z-aktivator replikacije virusa EBV (od engl. *Z EBV replication activator*)

1. UVOD

1. 1. KROMOSOMI

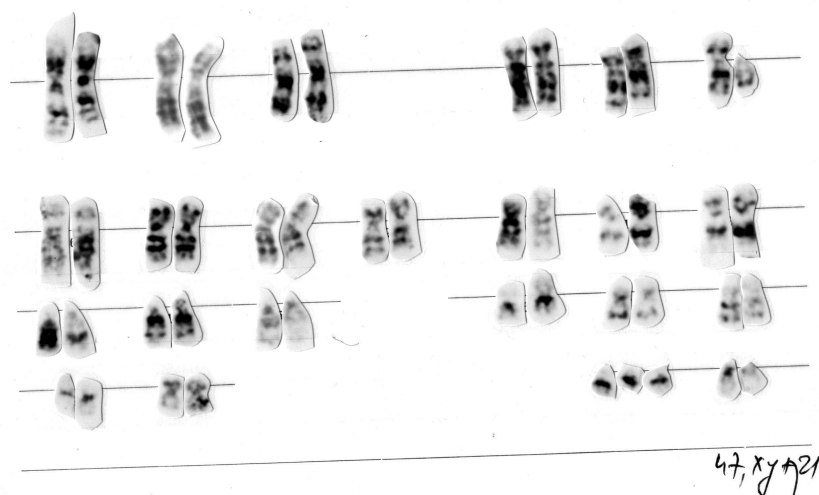
Kromosome je prvi otkrio C. von Nägel 1842. godine, a naziv im potječe od grčke riječi koja znači obojeno tjelešce. Kromosomi su kromatin, točnije kromatinske niti (1, 6). Nalaze se u jezgri stanica, a izgrađeni su od jedne molekule DNA i brojnih proteina. Kromosom je izgrađen od molekule DNA koju debljina proteina vezanih na vanjsku površinu molekule dijeli u 2 kraka odvojena centromerom (u području centromere sloj je proteina najtanji). Kratki krak označava se slovom «p» (od fr. *petit*: mali), a dugi krak sa «q» (prema sljedećem slovu fr. abecede). Broj kromosoma je stalan i karakterističan za svaku vrstu. Čovjek ima 46 kromosoma, tj. žena 46,XX, a muškarac 46,XY. Nepravilan broj pojedinog para kromosoma nazivamo aneuploidija, tj. >46 i <46. Osnovni mehanizam nastanka aneuploidije je nerazdvajanje kromosoma tijekom mejoze ili mitoze. Javlja se u 4% svih trudnoća. Najčešći su uzrok pobačaja i rođenja djeteta s malformacijama i/ili mentalnom retardacijom. Jerome Lejeune je 1959. godine otkrio pojavu viška kromosoma (47) u osoba s mentalnom retardacijom, tj. Downovim sindromom (slika 1) (1).

Naziv kromosom rabi se za oznaku kromatinske niti kad je stanica u mitozu ili mejozi, a obrnuto, naziv kromatinska nit, za oznaku kromosoma kada je stanica u interfazi. Jedina razlika između kromatinskih niti i kromosoma je stupanj spiralizacije molekule DNA. Molekula DNA u kromatinskoj niti slabije je spiralizirana nego u kromosomu. Stoga se pojedinačne kromatinske niti, koje se na početku mitoze jako spiraliziraju, vide mikroskopom kao zasebne «tvorevine» - kromosomi. Tijekom interfaze pojedinačne je kromatinske niti nemoguće vidjeti. Zbog dužine i isprepletenosti vide se kao tamnija (heterokromatin) i svjetlija područja (eukromatin) niti, odnosno jezgrica (lat. *nucleolus*).

Pojedinačna kromatinska nit jedne vrste stanica pojedinim svojim dijelovima može

istovremeno pripadati i heterokromatinu i eukromatinu i jezgri. U nekoj drugoj vrsti stanica istog organizma ta ista kromatinska nit može pripadati heterokromatinu, eukromatinu i jezgri svojim drugačijim dijelovima. Ovo je zbog činjenice da se na heterokromatinu nalaze geni koji u dotičnoj stanici nisu transkripcijski aktivni. Dijelovi kromatinske niti koji nose, za tu stanicu transkripcijski aktivne gene, čine u stanici eukromatin. Dijelovi kromatinskih niti na kojima se nalaze geni koji kodiraju sintezu ribosomalne RNA tvore jezgricu. Na završecima svakog kraka kromosoma (molekule DNA) nalaze se telomere. To su specijalizirani dijelovi DNA sastavljeni od uzastopno ponovljenih nizova nukleotida s bazama TTAGGG.

Centromera je poseban dio kromosoma na koji se tijekom mitoze vezuju niti diobenog vretena. Centromera je heterokromatin izgrađen od satelitne DNA. Iako na klasičnim mjestima, npr. u pericentromernom području, vidimo slične količine heterokromatina postoje slučajevi kada se količine materijala znatno razlikuju. Tada govorimo o polimorfizmu konstitutivnog heterokromatina. On je naročito izražen na pojedinim kromosomima 1, 9, 16, Yq, satelitima kromosoma 13, 14, 15, 21 i 22.



Slika 1. Kariogram (47, XY+21) - trisomija 21, Downov sindrom.

Svaka gameta sadrži haploidni broj kromosoma. Diploidni broj kromosoma stvara se ponovo nakon oplodnje, tj. nakon spajanja projezgre spermija s projezgrom jajne stanice. Naime, u jajnu stanicu ne ulazi cijeli spermij nego samo njegova jezgra (rep i tijelo spermija ostaju izvan jajne stanice).

Zanimljiva je i činjenica da proces nastanka jajne stanice (početak mejoze, profaza I) započinje već za vrijeme fetalnog razvoja ženskog djeteta - tijekom osmog mjeseca intrauterinog života. Zato se odmah nakon rođenja u jajnicima ženskog novorođenčeta već nalazi oko 3 milijuna oocita I reda u fazi profaze I mejoze. U ovom obliku ostaju sve do puberteta. Tek se u pubertetu mejoza oocita I reda nastavlja tijekom menstruacijskih ciklusa. Zametne stanice germinativnog epitela sjemenika ponašaju se različito. Tek u vrijeme puberteta iz njih, procesom mitoze, nastaju brojne spermatogonije, a potom i spermatocite I reda iz kojih, neprekidnim mejozama cijelog fertilnog razdoblja života muškarca, nastaju milijuni zrelih spermija.

Najvažniji događaj mejoze je pojava *crossing over-a*, tj. izmjena dijelova kromatida između homolognih kromosoma, čime se osigurava rekombinacija genetskog materijala (1, 2, 5).

Nerazdvajanje kromosoma homolognog para nakon *crossing over-a* često je tijekom ljudske gametogeneze. Kako u tom slučaju jedna gameta dobije oba kromosoma jednog para (disomična gameta) a druga niti jedan (nulsomična gameta), jedna je trećina embrija, nastalih od takvih gameta, trisomična ili monosomična.

Nerazdvajanje se može dogoditi i u drugoj mejotskoj diobi za vrijeme anafaze II, kada se kromatide jednog kromosoma u normalnim uvjetima razdvajaju da bi se napokon, nakon telofaze II, našle u budućoj gameti. I u ovom slučaju nastaju disomične ili nulsomične gamete koje, ako sudjeluju u oplodnji, uzrokuju razvitak trisomičnih ili monosomičnih embrija.

Uzroci nerazdvajanja još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Hipoteze uključuju

nastanak prolongiranih sinapsi koje onda povlače oba kromosoma u istu stanicu – kćer, odnosno nedostatak pravilnih sinapsi zbog čega se kromosomi ne mogu poredati uz metafaznu ploču.

Tijekom oogeneze većina se nerazdvajanja događa u prvoj mejotskoj diobi, najčešće u parovima kromosoma brojeva 8, 13, 15, 16, 18, 21, 22 i X. Tijekom spermatogeneze česta je pojava nerazdvajanja za 22. par kromosoma. Tijekom oogeneze češće je nerazdvajanje autosoma (prva mejotska dioba), a tijekom spermatogeneze nerazdvajanje gonosoma. Zbog toga je u muškaraca česta aneuploidija 47, XYY (dvostruki Y), odnosno 47, XXY (Klinefelter sindrom u 50% slučajeva). Monosomija kromosoma X najčešće se zbiva zbog manjka očevog kromosoma X. Nerazdvajanje koje nastupa jedno iza drugog u obje mejotske diobe može dovesti do tetrasomije (polisomija X). Drugi način nastajanja dvostruke aneuploidije je nerazdvajanje istog para kromosoma u gametama roditelja. Ako nerazdvajanje nastaje u drugoj mejotskoj diobi, zigota će imati dvije kopije jednog roditeljskog homologa. Ova se pojava naziva uniparentna disomija (UPD).

Nerazdvajanje kromatida može se dogoditi i za vrijeme mitoze. To je tzv. mitotsko (somatsko, postzigotno) nerazdvajanje. Uzrokom je nastanka mozaicizma.

Prerano odvajanje kromatida je drugi način nastanka aneuploidije. Događa se zbog preranog odvajanja sestrinskih kromatida. Umjesto u anafazi II odvoje se u anafazi I, pa tako oocita u drugoj mejotičkoj diobi (do anafaze II) nosi 23 kromosoma izgrađenih od dvije kromatide s dodatkom još jedne kromatide ($23 + 1/2$). Polociti I reda stoga manjka jedna kromatida. To je tzv. nebalansirano prerano odvajanje kromatida. Ukoliko se isto (prerano odvajanje sestrinskih kromatida) dogodi s oba kromosoma koji čine homologni par kromosoma, onda oocita tijekom druge mejotske diobe nosi 22 kromosoma sastavljena od još uvijek povezanih sestrinskih kromatida, plus još dvije zasebne kromatide. Ovo je balansirano prerano

odvajanje kromatida.

Jedini dokazani uzrok nastanka preddiobe i nerazdvajanja je dob; potvrđen je češćom pojavom u majki starijih od 35 godina. Prerano odvajanje je češći uzrok aneuploidije od klasičnog nerazdvajanja i češći je u starijih majki. Posebno veliki broj aneuploidija uzrokovanih nerazdvajanjem nastaje tijekom oogeneze, vjerojatno zbog propadanja, tijekom vremena, čimbenika koji podupiru adheziju homolognih kromosoma. Naime, za uspješno odvajanje homolognih kromosoma tijekom prve mejotske diobe nužno je održavanje fizičke veze (adhezije) između dva homologna kromosoma sve do I anafaze.

Druga teorija govori o važnosti “motornih proteina”; to su proteini centromera i diobenog vretena. Njima se centromere dviju sestričkih kromatida vežu za niti diobenog vretena samo jednog (istog) pola stanice. Adhezija i djelovanje «motornih proteina» smanjuje se d godinama žene. U kombinaciji s lokalnim čimbenicima (kao što je ostatak oocita u ovariju) i ostalim čimbenicima organizma, kakva je promjena razine hormona hipofize s godinama života, uzrokuju oštećenje jedinstva procesa mejoze. Prema ovim saznanjima jasno je da starija žena ima veću sklonost stvaranju aneuploidnih zametaka (1, 3).

Razumijevanje mehanizama kojima se održava integritet jezgre te mehanizama kojima se reguliraju i koordiniraju zbivanja u jezgri gotovo su nejasni. Jedino je sigurno - virusne infekcije, ekspresija onkogena i nasljedne bolesti mogu prouzročiti duboke i specifične promjene u njejoj organizaciji i funkcioniranju. S genetskog su stajališta kromatinske niti jezgre stanice u interfazi od ključnog značenja. U takvoj jezgri pojedine kromatinske niti tj. kromosomi zauzimaju površine koje nazivamo kromosomskim teritorijima (područjima). Ova su područja međusobno odijeljena kanalima, tzv. interkromosomskim područjima ili domenama.

Aktivni geni pojedinih kromatinskih niti grupiraju se na periferiji kromosomskih

područja. Stoga se i molekule mRNA najčešće nalaze na površini tih teritorija. Odatle prelaze (tijekom procesiranja) u kanale interkromosomskih područja kojima «putuju» do pora membrane jezgre kroz koje izlaze u citoplazmu. Proizlazi da, u usporedbi s manje aktivnim genima pojedine stanice, aktivni geni zauzimaju veću površinu povezanu s kanalima interkromatinskih područja. U pojedinoj se stanici transkripcijski aktivni i neaktivni geni jedne kromatinske niti izmjenjuju pravilno. Međutim, zbog dužine kromatinske niti i njezinog «spetljanog» izgleda za vrijeme interfaze, područja transkripcijski aktivnih u odnosu na transkripcijski neaktivne gene jedne kromatinske niti strogo su odijeljene unutar zasebnih kromosomskih teritorija. Transkripcijski aktivni geni, koji se repliciraju ranije za vrijeme S-faze interfaze, dio su kromosoma koji nazivamo R-područja. Suprotno tome, transkripcijski slabije aktivni geni grupirani su u tzv. G-područjima. R-područja kromatinskih niti nalaze se obično u unutrašnjosti jezgre (eukromatin), a G-područja smještena su u periferiji, uz membranu jezgre (heterokromatin).

U kromosomima su, zbog njihove izražene kondenziranosti, G-pruge i R-pruge (područja) blizu jedne drugima. Na kraju mitoze, kada se kromosomi ponovo despiraliziraju i pretvaraju u kromatinske niti, razdvajanje R-pruga i G-pruga u odvojene dijelove kromosomskih teritorija nije zanemariv proces. Kako tijekom pojedinih faza životnog ciklusa stanice neki geni mogu u jednom trenu biti transkripcijski aktivni a u nekom drugom neaktivni, jasno je da se pregrupiranje dijelova kromatinskih niti iz eukromatinskih u heterokromatinska područja i obrnuto, događa stalno, tijekom cijele interfaze (1, 6, 7, 8, 9, 10).

1. 2. ZAMETAK I TRUDNOĆA

Začeće i trudnoća su istodobno vrlo ranjiv i vrlo moćan proces. Ranjiv je zbog činjenice što značajan postotak zametaka nosi abnormalosti kromosoma zbog kojih će većina trudnoća završiti pobačajem. Moćan je zbog činjenice da više od 99% trudnoća završi rođenjem zdravog

djeteta (2).

Nebalansirane promjene kromosoma (aneuploidija) nalaze se u manje od 1% novorođene djece. Među svim ispitivanim vrstama ljudi su najviše skloni stvaranju aneuploidnih spolnih stanica. Warburton je ovu pojavu objasnio pozitivnom selekcijskom evolucijom: pobačaj embrija s aneuploidijom omogućuje bolji razvoj živih srodnika, povećavajući im mogućnost da dožive dob kada će i oni biti sposobni za reprodukciju (2, 10).

Brojčano, spermija se stvara znatno više nego jajnih stanica. Ipak, je 25 - 50% jajnih stanica citogenetski promijenjeno. Većinom se radi o hiperhaploidiji (24 kromosoma, jedan kromosom viška). U hipohaploidiji nedostaje jedan kromosom ($n = 22$). Ovakvim abnormalnostima mogu nastati zigote s trisomičnim i monosomičnim brojem kromosoma. Mogućnost nastanka aneuploidije raste s dobi majke, a najčešće je prouzročena nerazdvajanjem kromosoma (2).

Primjerice, od 20 000 kariotipiziranih spermija zdravih osoba 10% nosi promjene kromosoma (1). Aneuploidija se nalazi u oko 1-3% spermija, a 5-10% nosi strukturne promjene kromosoma. Mnoge od tih promjena nastaju tijekom spermatogeneze kao neposredna postmitotska promjena. Ako aneuploidna gameta (nulsomična ili disomična) oplodi normalnu gametu nastaje aneuploidni zametak (monosomik ili trisomik). Diploidna gameta u kombinaciji s normalnom gametom stvara triploidni zametak. Ako pretpostavimo da otprilike 20% oocita može biti aneuploidno, a da 10% spermija nosi neku promjenu kromosoma i uz uvjet da imaju jednaku oplodnu sposobnost, možemo očekivati oko 30% zametaka s nekom nenormalnošću kromosoma. Triploidija može nastati i zbog dispermijske (dva spermija oplode jednu jajnu stanicu). Samo jedna nenormalna postziogotična stanična dioba stvara mozaicizam, što je čest slučaj.

Kratko razdoblje brazdanja i pretvorba embrija iz morule u blastocistu, glavno je

razdoblje tijekom kojeg nastaju mnoge nenormalnosti kromosoma koje mogu uzrokovati pre-“embrijski arest”. Ukoliko se to ne dogodi, razvoj blastociste se nastavlja uobičajenim razdobljima embrionalnog razvitka tijekom kojih uvijek postoji mogućnost odbacivanja embrija. Gubitak trudnoće u kasnijem dijelu prvog tromjesečja ili ranijem dijelu drugog tromjesečja prepoznaje se kao “klinički pobačaj”.

Jedan dio zametaka čovjeka nosi letalno genetsko opterećenje i stoga se ne implantiraju. I takve, neimplantirane morule ili blastociste, također smatramo trudnoćama pa se i njihovo odbacivanje smatra pobačajem. Prolazna implantacija može biti povezana s blažim poremećajem menstrualnog ciklusa. Ipak, žena se može «osjećati» trudnom zbog uobičajenih hormonskih promjena (1, 2).

Monosomija i jak mozaicizam mogu biti letalni i prije no što se morula pretvori u blastocistu, ili samo dosegne stadij blastociste. Učestalost i udio aneuploidije u blastocisti jednaka je kao i u pobačaju koji se događa u kasnijem dijelu prvog tromjesečja trudnoće. U kasnijem dijelu prvog tromjesečja trudnoće (uglavnom pred kraj) događa se otprilike 10-15% kliničkih, odnosno spontanih pobačaja. U oko 50% takvih slučajeva postoje promjene kromosoma (1, 3, 8). Promjene kromosoma nađene su u još većem broju zametaka pobačenih prije 10. tjedna trudnoće, u 60% zametaka nađene su trisomije (1, 4, 5, 13). Najčešće su to trisomija kromosoma 16 (17), monosomija kromosoma X i triploidija. Najčešći uzrok aneuploidije je nerazdvajanje kromosoma tijekom oogeneze; ovo se osobito odnosi na kromosome 13, 14, 16, 21 i 22. Triploidija može biti i odraz diandrije ili diginije, odnosno udvostručenog materijala koji dolazi od oca ili majke. Najveći broj triploidnih zametaka pobaci se između 10. i 20. tjedna trudnoće. Većina ih je diandrična. Diandrija je uvijek posljedica oplodnje jedne jajne stanice s dva spermija (dispermija). Diginija najčešće nastaje zbog diploidne

jajne stanice; može nastati zbog nerazdvajanja cijelog seta kromosoma u prvoj ili drugoj mejotskoj diobi, zadržavanjem polarnog tjelešca ili oplodnjom primarne oocite. Uniparetalna disomija nije uzrok pobačaja (1, 3).

Embrio i fetus mogu ali ne moraju biti prisutni u materijalu dobivenom nakon spontanog pobačaja. Kod vrlo izražene neorganiziranosti rasta u tkivu se ne raspoznaju dijelovi embrija (prazna i anembrijska vreća, ili *hydrovum*, ili *blighted ovum*). U blažim oblicima neorganiziranog rasta raspoznaju se cefalični i kaudalni dijelovi embrija. Za odbacivanje zametka iz maternice odgovorno je smanjenje krvožilne i endokrine funkcije tkiva posteljice. Ovo uzrokuje nekrozu decidualnog tkiva što pak izaziva iritaciju maternice i njenu kontrakciju. Za smanjenje krvožilne i endokrine funkcije tkiva posteljice odgovorna je apoptoza korionskih resica. Naročito je izražena u pobačajima embrija u kojima postoje abnormalnosti kromosoma. Ovo je vrlo uočljivo u blizanačkoj trudnoći; plod s kariotipskim promjenama često umire (*fetus papyraceus*), a drugi s normalnim kariotipom razvija se. Nakon poroda se u fibroziranom dijelu placente gdje je zaostalo tkivo odumrlog ploda nalazi i njegov promijenjen kariotip (1, 2).

Gubitak trudnoće sredinom drugog tromjesečja zove se intrauterina fetalna smrt. U oko 50% takvih slučajeva opažene su promjene broja kromosoma; najčešće trisomija kromosoma 18. Mrtvorodena djeca, kao i/ili ona umrla u perinatalnom razdoblju, često imaju promjene kromosoma. Nebalansirani kariotip se javlja i u živorođene djece s učestalošću od 1:250 (2).

Učestali (rekurentni, habitualni) pobačaj događa se i u osoba urednog konstitucijskog kariotipa. Stvaran razlog tome je nepoznat. Drži se kako takve osobe možda imaju neku predispoziciju za stvaranje aneuploidnih zametaka, poput primjerice postojanja nekih recesivnih gena, abnormalnosti kromosoma roditelja, gonadnog mozaicizma, pojačane asocijacije satelita kod akrocentričnih kromosoma, što se češće viđa u kariotipovima roditelja djece s trisomijom 21.

Pobačeni plod je često aneuploidan što ukazuje na aneuploidiju gameta. U 90% ispitanih slučajeva radilo se o aneuploidiji jajne stanice (1). Broj takvih gameta povećava se sa starošću majke. Trisomije se javljaju u 80% slučajeva. Najčešće su trisomije kromosoma 15, 16 i 21 (14%, 15% i 8%) i triploidije (u 13% slučajeva) (1). U jednoj studiji ispitivani su embriji majki životne dobi između 30. i 36. godine, dobiveni tijekom *in vitro* fertilizacije (IVF), intracitoplazmatskog injiciranja spermatozoida (ICSI) i preimplantacijske genetske dijagnoze (PGD), pokazano je metodom fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) postojanje aneuploidije u 53% uzoraka. Najčešće su bile zastupljene nulsomije, monosomije, trisomije i tetrasomije autosoma (13, 16, 18, 21, 22). U 5% uzoraka nađene su promjene broja spolnih kromosoma: 45, X; 47, XXX; 47, XYY (1).

Hidatiformna mola (HM, od engl. *Hydatiform mole*) je nenormalna trudnoća koju obilježava promijenjen/povećan broj kromosoma oca. Prema fenotipu i kariotipu, razlikujemo nepotpunu i potpunu HM. Fenotipske promjene HM odnose se uglavnom na korionske resice. Zbog proliferacije epitela koji pokriva korionske resice, stvaranja cističnih šupljina i promijenjenog krvožilja resica, korion se pretvara u neorganiziranu masu ispunjenu tekućinom. Otuda i naziv *hydatiform mole* (lat. *Hydatid*: kapljica vode; *hydatiform*: ono što sličih hidatidnoj cisti; lat. *Mole*: masa bez neke posebne strukture). U slučaju potpune HM (svi kromosomi očevi) fetus se ne razvija, a zloćudni je potencijal HM veoma visok. U slučajevima nepotpune HM (23 kromosoma od majke, 46 kromosoma od oca) fetus je prisutan ali nije živ, a zloćudni je potencijal HM vrlo nizak. Zbog HM poremećen je normalni feto – placentni razvoj. Razvitku HM, naročito potpunog oblika, osobito su podložne žene na početku (mlađe od 20 godina) i kraju reproduktivnog razdoblja (starije od 40 godina). Učestalost potpune HM iznosi 1:2000 dijagnosticiranih trudnoća, ali postoje područne i etničke razlike. Etiologija ponovljenih oblika

HM je nepoznata; moguća je genetska predispozicija vezana uz aktivnost nekih recesivnih gena.

Pobačaj djelomične HM naziva se *abortus incompletus* i *abortus retentus/missed abortion*. Javlja se krajem prvog tromjesječja trudnoće, najčešće oko 12. tjedna. Korionske resice promijenjene su na već opisani način, a placenta je nenormalno velika. Učestalost djelomične HM je 1:700 trudnoća (1, 3, 6).

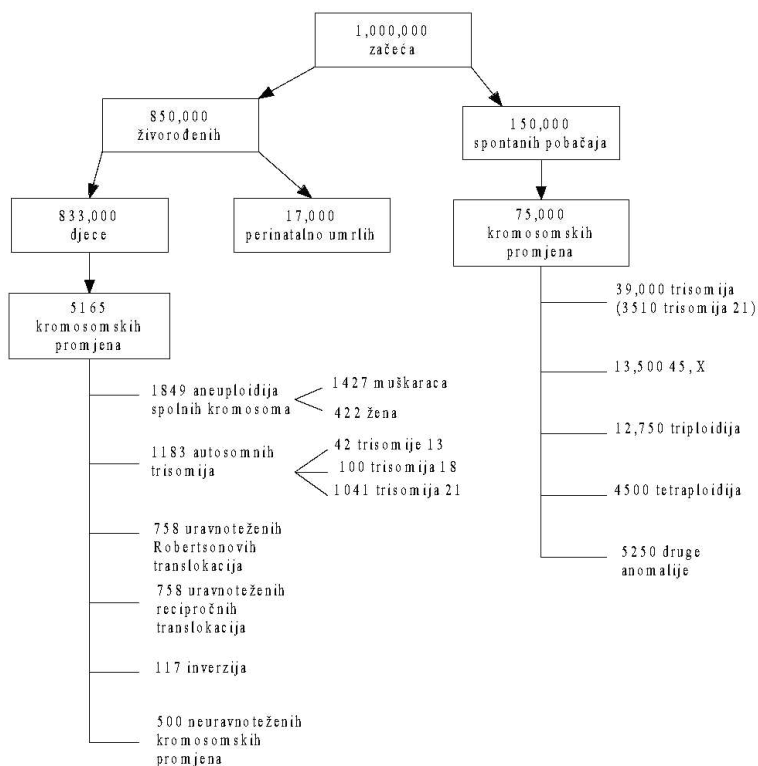
Otprilike u 1 – 2% slučajeva placenta može imati različit broj kromosoma u odnosu na embrij; embrij ima normalan broj kromosoma, a tkivo placente je trisomično. Ovakvo se stanje naziva placentni mozaicizam (1, 5). Koristi se u prenatalnoj dijagnostici tijekom trećeg tromjesječja trudnoće. Nalaz je važan i za znanstvena istraživanja, primjerice za metodu protočne citometrije.

Od 1.000.000 začeca 150.000 završi kao spontani pobačaji, dok ih 75.000 ima kromosomske aberacije. Abnormalnost kromosoma fetusa koja je nespojiva sa životom javlja se u 25 do 60% pobačaja (slika 2).

Aneuploidija je najčešći oblik nenormalnosti broja kromosoma u ljudi. Prisutna je u 0,3% novorođenih i otprilike 50% spontanih pobačaja (3, 5, 10). Glavni je uzrok gubitka trudnoće i nastanka mentalne retardacije. Prvi put je opisana prije 35 godina. Usprkos velike učestalosti, kliničke važnosti i snažnog utjecaja na reprodukciju ljudi, uzroci nastanka, posebice vanjski čimbenici, nepoznati su. Ipak, razvojem rekombinantne tehnologije DNA, mogućnostima istraživanja na zamecima i pobačenom materijalu, dokazano je da je većina trisomija majčinog podrijetla, prouzročena nerazdvajanjem kromosoma (kromatida) vezanim uz stariju životnu dob. Poremećeni su i broj i mjesta *crossing over*-a (7, 8).

Rekombinacija homolognih kromosoma ključni je događaj mejoze; osim «miješanja» genetskog materijala osigurava i pravilno razdvajanje homolognih kromosoma tijekom prve

mejotske diobe. Rekombinacijom kromosoma tijekom mejoze postiže se genetska varijabilnost koja je jedna od osnova prirodne selekcije. Učestalost rekombinacija razlikuje se između kromosoma. Postoje kromosomi i njihovi dijelovi na kojima su rekombinacije češće ili rjeđe. To su tzv. «vruće» (engl. *hot spots*) i «hladne» točke (engl. *cold spots*). Proučavanjem načinjenim uglavnom na kvascima, proizašle su neke osnovne osobitosti «vrućih» točaka.



Slika 2. Učestalost promjena broja kromosoma na 1 000 000 začeca (modificirano prema Beers MH i Berlow R. The Merck manual of diagnosis and therapy. Merck research laboratories, division of Merck & Co. Inc. White house station, N.J. 1999, str. 62.) (214)

To su: a) većina «vrućih točaka» nalazi se u područjima DNA između gena; b) genetski definirane «vruće» točke povezane su često s dvolančanim lomovima DNA; c) dvolančani lomovi DNA javljaju se uglavnom u područjima DNA osjetljivim na DNazu; d) da bi se u «vrućoj» točki dogodila rekombinacija na ta se mjesta prethodno moraju vezati transkripcijski čimbenici; takve se «vruće» točke zovu χ točke; e) «vruće» točke koje podliježu pucanju i

rekombinaciji bez posredovanja transkripcijskih čimbenika nazivaju se χ točke. Mehanizmi koji određuju aktivnosti “vrućih točaka” osjetljivi su i na čimbenike iz okoliša (9).

Na slici 2. prikazana je učestalost promjene broja kromosoma na 1 000 000 (214). Svi kromosomi nisu jednako podložni nerazdvajanju tijekom mejoze. Ovom su procesu, izgleda, najpodložniji kromosom 16 i, općenito, akrocentrični kromosomi. Dužina kromosoma, dužina pericentričnog dijela, dužina ponavljajućih dijelova kromosoma i položaj centromere određuju sklonost pojedinih kromosoma aneuploidiji (10, 11).

Dob majke ne djeluje jednako, u smislu pojave aneuploidije, na sve kromosome. Aneuploidije pojedinih kromosoma ovisi i o vremenu događanja nerazdvajanja kromosoma; prva ili druga mejotska dioba, mitotičko nerazdvajanje. Učestalost nerazdvajanja kromosoma (prva mejotička dioba) u izravnom je pozitivnom odnosu s dobi majke; najčešće zahvaća autosome (trisomija autosoma). Aneuploidije spermija odnose se uglavnom na gonosome. Posljedica su nerazdvajanja kromatida tijekom druge mejotske diobe; i u izravnoj su pozitivnoj vezi s dobi oca. Trisomija kromosoma 18 jedina je posljedica greške nerazdvajanja autosoma oca tijekom II mejotske diobe. Općenito, aneuploidija se javlja u 2 – 4% spermija, a vezana je uz stariju dob. Aneuploidija je češća u žena. Javlja se u čak 8,6% oocita i, kao i u muškaraca, povezuje se sa starijom dobi majki (12, 13).

Ove promjene pokazuju da konstitucijska aneuploidija nastaje pod utjecaja mnogostrukih mehanizama koji djeluju na: 1) vrijeme i narav stvaranja greške i u jajnoj stanici i u spermiju, 2) vrijeme nastanka nerazdvajanja: prva ili druga mejotska dioba, mitotičko nerazdvajanje, i 3) selekciju nekih specifičnih kromosomskih aneuploidija kroz embrionalni razvoj (12, 13, 14).

Na stvaranje pogrešaka kromosoma općenito, a posebice aneuploidija, utječe i rearanžman kromatinskih niti jezgre u interfazi (15). Važan mehanizam rearanžmana je

fosforilacija histona 3 (H3). Započinje nepravilno u pericentromeričnom heterokromatinu u kasnoj G2-fazi interfaze diobe stanice i traje do početka kondenzacije kromatinskih niti kojima će se pretvoriti u kromosome kakvi se vide u profazi. Znači da postoji točan prostorni i vremenski odnos između H3 fosforilacije i početnog stadija kondenzacije kromosoma (16, 17).

U spontano pobačenom embriju s trisomijom kromosoma 2, 7, 15 ili 22 histološka analiza često pokazuje hiperplaziju trofoblasta. Trisomija kromosoma 2 najčešće je očeva podrijetla, dok trisomija kromosoma 7 nastaje postzigotično. Embriji s trisomijom očeva podrijetla pobacuju se ranije od onih s trisomijom majčinog podrijetla. Vjerojatno stoga što aneuploidija očevog podrijetla snažnije djeluje na embrionalni stadij naročito podložan odbacivanju zametka (18).

Ispitivanja na oocitima nakon IVF-e pokazala su, da na razvoj oocite nakon oplodnje djeluju različiti unutarnji i vanjski čimbenici, kao npr. količina kisika u folikularnim stanicama. Ovaj je čimbenik udružen s nižim vrijednostima adenzin trifosfata (ATP) i smanjenjem unutarstanične vrijednosti pH tijekom II metafaze stadija oocite. U takvim se oocitama često događa aneuploidija, različite patološke promjene citoplazme, a imaju i slabiji razvojni potencijal (19). Do sada provedena istraživanja u području klasične i eksperimentalne genetike, posebice genskog upisa (*imprintinga*), pokazuju da su za ishod trudnoće i razvoj zdrave osobe podjednako važni i majčin i očev genom. Istraživanja provedena na oocitama miša, oplodjenim spermijima obilježenim bromodioksiuridil (BrDU), pokazala su da je kromatinski materijal roditelja prostorno odvojen tijekom početnog embrionalnog razvoja, sve do stadija morule. Tako genomi oba roditelja mogu utjecati na programiranje razvoja embrija u ranom stadiju trudnoće (20-25).

Za sada nisu poznati svi uzroci mejotskog nerazdvajanja i nastanka aneuploidija. Istraživanja pokazuju da su potrebne dvije promjene (*two hits* model), koje u konačnici dovode do mejotskog nerazdvajanja. Prva nastupa tijekom I profaze “osjetljivog” bivalenta, a druga u I ili

II metafazi (26).

1. 3. TERATOGENI

Teratogeni su tvari koje tijekom embrionalnog ili fetalnog života mogu izazvati abnormalnosti oblika ili funkcioniranja ploda, tj. nakaznost ploda. Tako djeluju različite kemijske tvari, fizikalni čimbenici, mikroorganizmi te višak ili manjak nekog elementa u organizmu.

Njihovo djelovanje uzrokuje: 1) smrt stanice, 2) izmijenjen rast tkiva (hiperplazija, hipoplazija, asinhroni rast), 3) promjenu diferencijacije stanica, i 4) promjenu morfogogenetskih procesa. Sve to rezultira: 1) neplodnošću, 2) prenatalnim zastojem rasta (IUZR – intrauterini zastoj rasta), 3) kongenitalnim anomalijama organa, 4) promjenama u središnjem živčanom sustavu.

Lijekovi i kemijski agensi teratogenog djelovanja su npr. talidomid, varfarin, retinoidi, aminopterin, metotreksat, antiepileptici, litij, živa, olovo, kadmij, poliklorirani i polibromirani bifenili, ksilen i razna druga kemijska otapala. Dugotrajnije izlaganje ovim teratogenima može imati pogibeljan učinak na razvoj fetusa. Nadalje, zbog mutagenog djelovanja uzrokom su nastanka raznih bolesti, poput akutne leukemije dječje dobi. Povezanost pobačaja fetusa i kancerogenog djelovanja teratogena pokazana je nalazom većeg broja spontanih pobačaja u majki koje su kasnije rađale djecu u kojih se razvila leukemija (27).

Izloženost mnogim kemijskim agensima (u kući, na poslu) i njihovim konzumiranjem u hrani i piću, može uzrokovati neplodnost i spontane pobačaje. Istraživanjima na miševima pokazano je da kava (28), duhan (29), marihuana, alkohol, kokain, mononatrijev glutamat (dodatak hrani), ksilen, trikloretilen, petrolej, aceton, benzin, pesticidi ili silikon - smanjuju sposobnost oplodnje te tjelesnu težinu i dužinu potomstva. Razna kemijska otapala (30) i kemikalije koje se nalaze u vodi za piće također povećavaju postotak pobačaja. Jedno je

istraživanje pokazalo da su medicinske sestre izložene anestetiku tijekom trudnoće rađale, češće nego što je uobičajeno, djecu s kongenitalnim anomalijama (31). Profesionalni rizik izloženosti teratogenima prisutan je i u vatrogasaca, osoba zaposlenih u tekstilnoj, PVC i industriji gume, boja i proizvodnje antibiotika, u poljoprivrednika, osoba izloženih buci. U takvih je osoba nađen smanjeni broj spermija ili veći broj anomalija spermija što rezultira neplodnošću.

Postoje jasni dokazi o aneuploidiji izazvanoj kemikalijama u pokusnim sustavima. Međutim, mutageno djelovanje većine aneugena ne može se dokazati bakterijskim mutacijskim testovima. Većina ih uzrokuje poliploidiju i strukturne promjene kromosoma *in vitro*. Teratogeno djelovanje svih dosada poznatih aneugena dokazano je na miševima. Aneugeni imaju jednak učinak i na spolne i na somatske stanice (32).

Najpoznatiji **fizikalni teratogeni su** zračenje, razni mehanički podražaji i toplina. Mehanički teratogeni sprječavaju razvoj fetusa. Oni su npr.: dvoroga ili pregrađena maternica, miom maternice, polihidramnij, oligohidramnij, stvaranje intraamnijskih fibroznih tračaka, itd.

Osim teratogeno, zračenje djeluje i kao mutagen i kao kancerogen. Mutageni utjecaj rezultira oštećenjem gameta prije oplodnje, a teratogeni oštećenjem razvoja embrija.

Mutageni učinak zračenja različit je u muškaraca i žena. Ukoliko je do začeća došlo nekoliko dana ili tjedana nakon ozračivanja, u nerođenim potomcima ozračenih muškaraca vide se velike promjene strukture kromosoma. Pojačana učestalost točkastih mutacija vidi se u plodovima začetim duže vrijeme nakon ozračivanja. U žena je na ozračivanje posebno osjetljiva oocita za vrijeme njenog sazrijevanja u Graaf-ovom folikulu (33).

Izvan tog perioda rizik nastanka mutacija uzrokovanih zračenjem isti je kao u muškaraca. Treba naglasiti kako mutacija, nastala u fetusu izloženom zračenju, najčešće ne ispoljava u tom organizmu. Ispoljit će se tek u potomcima takvih osoba (ako pretpostavimo da je izazvana

mutacija dominantna).

U istim razdobljima embriogeneze učinci različitih teratogena na plod su isti. Najkritičnij razdoblje embriogeneze je od 18. do 60. dana. U 40% slučajeva smrt, teratogenu izloženog embrija, nastupa u razdoblju od 3. do 6. tjedna razvitka. Još 20% embrija umire prije 12. tjedna. U prva 2 tjedna embrionalnog razvitka vrijedi pravilo «sve ili ništa». Najosjetljivije razdoblje je vrijeme organogeneze, dakle vrijeme do 12. tjedna razvoja.

1. 3. 1. INFEKCIJSKI AGENSI

Virusi, paraziti i bakterije su najčešći uzročnici unutarmaternih infekcija (34). Infekcija ploda ovisi o vremenu i jačini infekcije; uzrokuje pobačaj, smrt ploda ili oštećenje organa i organskih sustava. Ponekad infekcija majke ne utječe na plod, a ponekad se može nastaviti i poslije poroda, kao akutna, kronična ili latentna.

Infekcije najčešće zahvaćaju mokraćni sustav trudnica. Mogu biti simptomatske i asimptomatske (7-10% trudnica). *Chlamydia trachomatis* uzrokuje spolno prenosivu bolest; nalazi se u 2-10% ženske i muške populacije (34). Infekcija spolnog sustava obično je u žena asimptomatska (34, 35).

Mycoplasma hominis i *Ureaplasma urealyticum* uzročnici su infekcija mokraćno-spolnog sustava. Najčešći su uzročnici spolno prenosivih bolesti (STD, od engl. *sexually trasmitted diseases*). U žena najčešće nastanjuju rodnicu, rjeđe endometrij maternice i mokraćnu cijev. U muškarca prvenstveno naseljavaju sluznicu mokraćnog sustava (34).

Perinatalna oštećenja nastala infekcijama javljaju se u 0,5-2,5% opće populacije. Uzrokovana su najčešće uzročnicima iz takozvane „TORCH“ skupine u koju se ubrajaju toksoplazma, virus ruboele, citomegalovirus (36, 37) i *Herpes* virusi (38). Drugi mikroorganizmi

poput *Treponema pallidum*, EBV, parvovirusa B19 (39, 40, 53), adenoasocirajućih virusa, HHV-6, HPV, *coxsackie*, virusa influence, RSV, rotavirusa, listerije, *Varicella zoster* virusa, uzročnika boginja i HIV, često su udruženi s raznim konatalnim manifestacijama (41).

Na velikom broju dosada provedenih istraživanja utvrđena je izravna povezanost infekcija uzrokovanih virusima i spontanih pobačaja (41, 53-57).

1. 3. 1. 1. VIRUSI

Virusi su jedinstveni primjer infekcijskih agenasa čije se osobitosti temelje na jednostavnoj građi, načinu umnažanja i nestaničnom ustrojstvu. Cjelovita virusna čestica, virion, sadrži jednu ili više molekula DNA ili RNA (genom) obavijenih kapsidom izgrađenom uglavnom od proteina, a u nekih virusa i ovojnicom (od engl. *envelope*). Virusi se ne mogu umnažati izvan stanice domaćina. Samo nukleinska kiselina virusa ulazi u stanicu domaćina. Neki virusi odmah započinju intenzivnu replikaciju i sintezu vlastitih proteina zbog čega u stanici domaćina nastaje mnoštvo novih virusnih čestica koje konačno uzrokuju lizu stanice i očituju se kao akutne infekcije. Nukleinska kiselina određenih virusa može se ugraditi u genom stanice domaćina ili ostati u episomalnom obliku. Zbog toga takvi virusi uzrokuju pritajenu (latentnu) ili trajnu (perzistentnu) infekciju. Obitelj virusa *Herpesviridae* dijeli se, temeljem građe genoma virusa, njihovog tkivnog tropizma, patoloških učinaka na stanicu, mjesta latentne infekcije, patogeneze i očitovanja bolesti, na tri podobitelji: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* i *Gammapherpesvirinae* (tablica 1) (41, 42).

Najpoznatiji za čovjeka patogeni virusi roda *herpes simplex* (HSV) su herpesvirus tip 1 (HSV-1) i herpesvirus tip 2 (HSV-2). Zajedničke su im osobitosti: visoka homologija genoma, srodnost antigena ovojnice, tkivni tropizam (mukoepitelne stanice) i simptomi bolesti koje uzrokuju (41).

HSV-1 i HSV-2 su uzročnici infekcija kože i sluznice. HSV-1 uzrokuje infekcije koje se obično očituju iznad struka, dok se infekcije uzrokovane HSV-2 očituju ispod struka. Ova se dva tipa virusa mogu razlikovati analizom genoma (DNA) ili tip specifičnim monoklonskim protutijelima (metode fluorescencije ili ELISA-metode).

Tablica 1. Herpesvirusi

Podobitelj	Rod	Najčešći patogeni virusi	Ciljna stanica	Mjesto latencije	Način širenja	
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	ljudski herpesvirus 1 (VHS 1)	mukoepitelna	neuron	dodir	
		ljudski herpesvirus 2 (VHS 2)	mukoepitelna	neuron	dodir	
		<i>Cercopithecine</i> herpesvirus 1 (majmunski herpesvirus B)		neuron	dodir, ugriz	
	<i>Varicellavirus</i>	ljudski herpesvirus 3 (VZV)	mukoepitelna	neuron	dodir, kapljice	
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	ljudski herpesvirus 5 (CMV)	monociti, limfociti, epitelne stanice	monociti, limfociti, ?	dodir, krv, kongenitalno	
		<i>Roseolovirus</i>	ljudski herpesvirus 6 (HHV 6)	limfociti T, ?	limfociti T, ?	dodir, kapljice
		ljudski herpesvirus 7 (HHV 7)	limfociti T, ?	limfociti T, ?	?	
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	ljudski herpesvirus 4 (EBV)	limfociti B, epitelne stanice	limfociti B	dodir (bolest poljupca)	
		<i>Rhadinovirus</i>	ljudski herpesvirus 8 (HHV 8 – povezan sa sarkomom Kaposi)			

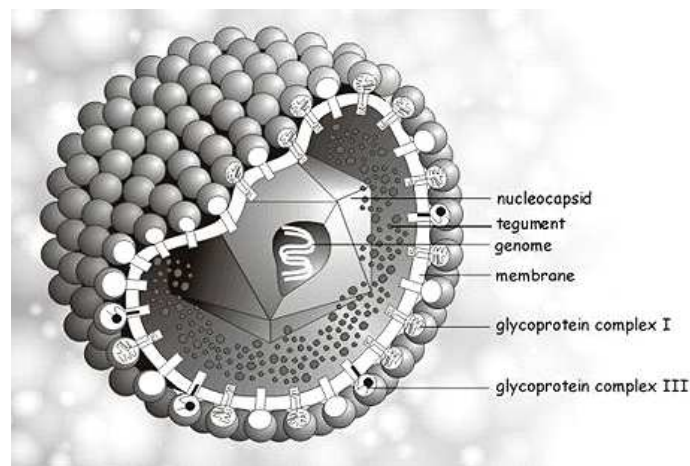
Preuzeto iz: Presečki V i sur. Virologija. Medicinska naklada, Zagreb, str. 143, 2002.

Rekurentne infekcije većinom se očituju blažim, lokalnim oblikom bolesti i traju kraće od primarnih. Virus se reaktivira unatoč prisutnosti specifičnih protutijela. Pokretač aktivacije virusa vjerojatno je stres. Herpesvirusi su rašireni po cijelom svijetu. Sposobnost herpesvirusa da uzrokuju latentnu infekciju i razvoj neprimjetnih opetovanih infekcija čine čovjeka doživotnim izvorom zaraze. Oko 85% infekcija prolazi bez jasnih, kliničkih znakova bolesti. U sredinama s većom naseljenošću i nižim socijalnim stupnjem razvijenosti veća je i učestalost seropozitivnih osoba. Infekcije spolnog sustava najčešće su uzrokovane HSV-om tipa 2. Prenose se spolnim putem. Zato su vrlo su česte u adolescenata. I HSV-1 uzrokuje infekcije spolnog sustava, u otprilike 10-25% slučajeva.

Opisani su slučajevi reaktivacije subkliničkog oblika herpesa spolnog sustava majke uzrokovanog stresom (primjerice trudnoća!) uslijed čega je, zbog prolaska virusa kroz posteljicu, došlo do razvoja infekcije ploda (42 - 44).

1. 3. 1. 1. 1. Cytomegalovirus (CMV). U jezgrama stanica domaćina ovaj virus stvara inkluzijska tjelešca slična *oku sove*. Virus uzrokuje latentnu infekciju i u mononuklearnim limfocitima, stanicama koštane srži i drugim organima. CMV je obavijeni DNA virus (slika 3).

Patogeneza infekcije CMV-om općenito je nalik patogenezi drugih herpesvirusa: 1) virus se širi od stanice do stanice i u prisutnosti specifičnih protutijela, 2) uzrokuje latentnu infekciju u domaćinu, i 3) reaktivacija infekcije pojavljuje se u stanjima imunosupresije. Ipak, za razliku od drugih herpesvirusa, CMV uzrokuje kratkotrajnu imunosupresiju domaćina i većinom neprimjetnu infekciju.



Slika 3. Shematski prikaz citomegalovirusa (41)

Reaktivacija virusa zbiva se tijekom imunosupresije i aktiviranja imunološkog sustava organizma alo-antigenima. Infekcija CMV-om djeluje imunosupresivno. To pospješuje uspostavljanje latentne infekcije i sprječavanje razvoja imunopatogeneze i znakova bolesti

(neprimjetna infekcija). Infekcija izazvana CMV-om javlja se u svih dobnih skupina, a može biti kongenitalna (tj. konatalna) i stečena. Infekcije u ljudi s CMV-om su vrlo česte jer se virus trajno izlučuje iz zaraženih stanica i širi se u okolinu (tablica 2).

Tablica 2. Asimptomatsko širenje citomegalovirusa

Podrijetlo	Novorođenčad	Djeca	Odrasli
Mokraća Sekreti	0,5-2,5%	10-29%	do 2%
Usna šupljina Grlić maternice	0,5-2,5%	10-29%	do 2% 10-28%*
Sjemeni tekućina			5-10%
Mlijeko (dojenje)			13-27%

*mogućnost izlučivanja CMV-a povećana tijekom posljednjeg tromjesečja trudnoće
Preuzeto iz: Presečki V i sur. Virologija. Medicinska naklada, Zagreb, str. 159, 2002.

U zemljama u razvoju s CMV-om inficirana je gotovo svaka odrasla osoba, dok je u razvijenim zemljama zaraženo 50% odraslog stanovništva. Tijekom fertilnog razdoblja 40-70% žena preboli infekciju CMV-om. Virusom je inficirano 3-5% trudnica uslijed čega se intrauterino zarazi i oko 1% (0,2-2,4%) plodova, tj. intrauterina infekcija uslijedi u 25% djece majki koje su se zarazile tijekom trudnoće. Virus se može izlučivati urinom i stolicom i 3 godine nakon primarne infekcije. Postnatalno se inficira oko 4% djece mlađe od 5 godina i 15-30% djece u dobi od 5-15 godina. Kasnije se mogu zaraziti spolnim putem (jer se CMV nalazi u spermi i cervikalnom sekretu), krvlju i krvnim pripravcima (leukociti, transplantirani organi) (34, 45, 46).

Analizom spontano pobačenih plodova utvrđeno je da se prvo inficira posteljica, a tek potom, eventualno, embrij ili fetus, i to majčinom krvlju izravno, preko citotrofoblasta. CMV se može izolirati iz sjemena pa se prije inseminacije iz uzorka moraju odstraniti leukociti jer se u njima nalazi virus. CMV može inficirati unutarnje spolne organe muškarca, a može uzrokovati i

uretritis te akutni i kronični prostatitis. U osoba s generaliziranim neimunim fetalnim hidropsom nađene su povišene vrijednosti protutijela IgM i IgG za CMV i virus parvo B19 kao rezultat majčine infekcije tijekom trudnoće. U razvijenim dijelovima svijeta 50-80% pučanstva zarazi se CMV-om već u djetinjstvu. U zdravoj populaciji infekcija nastaje egzogeno putem bliskog kontakta s osobom zaraženom CMV-om (slina, suze, majčino mlijeko (45), mokraća i druge izlučevine (46-48) itd). Nakon akutne asimptomatske faze infekcije virus se u latentnom obliku zadržava u raznim stanicama tijekom cijelog života, s povremenim reaktivacijama bolesti. Endogene reinfekcije javljaju se u 0,4-2,3% živorođenih (34, 41, 49).

1. 3. 1. 1. 2. Epstein-Barr-ov virus (EBV) član je podobitelji *Gammaherpesvirinae* i zarazi uglavnom limfoblastoidne stanice. U limfocitima se reakcija često zaustavlja u predlitičnom stadiju; genom virusa prisutan je u stanici ali ga je teško dokazati. Infekcija tada prelazi u litični stadij pa uzrokuje ugibanje stanice bez tvorbe cjelovitih viriona. EBV ima sve osobine HSV-a, ali se od njih razlikuje nekim antigenim i biološkim osobinama. Antigeni sastav EBV-a je veoma složen; antigeni se mogu dokazati reakcijom vezanja komplementa, imunofluorescentnim, imunoenzimatskim i imunoradijacijskim postupcima. Prema smještaju i aktivnosti, u zaraženoj stanici dijele se na: 1) antigene jezgre, 2) rane antigene koji se nalaze u nakupinama u citoplazmi, 3) rane antigene raspršene po citoplazmi i jezgri, 4) antigene virusne kapside koji se nalaze se u citoplazmi, 5) antigene prisutne na površini inficirane stanice i 6) antigene ovojnice virusa prisutne na površini inficirane stanice.

Genom virusa nosi tzv. litičke i latentne gene. Produkti litičkih ili replikativnih gena sudjeluju u replikativnoj ili litičkoj fazi infekcije, a produkti latentnih gena omogućuju opstanak virusa u latentnom obliku (tablica 3). U početku umnažanja prvo se prepisuju latentni geni; tvorbom EBNA 2 omogućeno je prepisivanje cjelovitog kompleksa *EBNA* (1-6), a potom i gena

LPM (od engl. *latent membrane protein*). Tijekom 48 do 72 sata završava se ekspresija latentnih gena. Unutar 72 sata napadnuta stanica prolazi svoj stanični ciklus (G1, S, G2) i ulazi u mitozu.

U zaraženim limfocitima B taj se ciklus bezgranično ponavlja. Fenotip tako blastno transformiranih limfocita ne razlikuje se od antigeno stimuliranih imunoblasta B. Te su stanice citogenetski normalne premda su genetički *vječne*. Samo do 5% *besmrtnih limfocita B* ulazi u litičku fazu infekcije (50, 51, 52).

Tablica 3. Produkti gena EBV-a

Replikativni (litički) geni
<p>Produkti neposredno ranih gena: <i>ZEBRA</i> (engl. <i>Z EBV replication activator</i>) <i>BZLF1</i> (transaktivacija drugih gena) (važni za početak prepisivanja)</p> <p>Produkti ranih gena: <i>EA/D</i> (engl. <i>Early antigens-diffuse</i>) <i>EA/R</i> (engl. <i>Early antigens-restricted</i>) (kompleks 30-tak enzima važnih za umnožavanje DNA, TK, polimeraze, prepisivanje kasnih gena)</p> <p>Produkti kasnih gena: strukturni proteini, VC, gp350</p>
Latentni geni
<p><i>EBNA</i> (EB nuclear antigen) 1 potreban za imortalizaciju, održavanje episoma <i>EBNA</i> 2 potreban za imortalizaciju, virusni onkogen <i>EBNA</i> 3 potreban za imortalizaciju <i>EBNA</i> 4 funkcija nepoznata <i>EBNA</i> 5 aktivira p53 <i>EBNA</i> 6 potreban za imortalizaciju, virusni onkogen <i>LMP</i> potreban za imortalizaciju, virusni onkogen, aktivira stanične gene <i>TP1</i> sprječava mobilizaciju Ca <i>TP2</i> funkcija nepoznata <i>EBER</i> (EB encoded RNA) 1 i 2 reguliraju aktivnost RNA protein kinaze</p>

*Preuzeto iz: Presečki V i sur. Virologija. Medicinska naklada, Zagreb, str. 153 2002.

Nakon infekcije, latentne ili manifestne, EBV se može dugo, čak i doživotno, zadržati u

epitelu orofarinksa i izlučivati slinom. Takvi ljudi predstavljaju stalan izvor zaraze. U zemljama s lošim socijalno-ekonomskim prilikama, zbog niskog higijenskog standarda, djeca se inficiraju u ranoj dobi; tada infekcija najčešće prolazi latentno ili se manifestira samo blagim i nekarakterističnim pojavama bolesti.

U ekonomski razvijenim zemljama, s višim higijenskim standardom, infekcija EBV-om češće uslijedi tek u školskoj dobi ili kasnije. U toj dobi obično se manifestira kliničkom slikom infektivne mononukleoze. Opisana je pojava leukemije kod djeteta majke s akutnom infektivnom mononukleozom tijekom trudnoće (51).

O transplacentarnom prijenosu EBV-a, glede primarne ili reaktivacijske infekcije iz majke u fetus i pobačaja prouzročenog ovakvim prijenosom virusa ne zna se mnogo. Stoga se trudnicama savjetuje izbjegavanje kontakata s osobama koje boluju od infektivne mononukleoze. Isto tako, žena ne bi smjela planirati trudnoću u vrijeme kada u krvotoku nosi EA-protutijela. Infekcija majke tijekom trudnoće čest je uzrok malformacije organa i/ili smrti ploda (34, 41, 52).

1. 3. 1. 1. 3. HUMANI PAPILOMAVIRUSI (HPV, od engl. *human papilloma virus*) pripada obitelji *Papovaviridae* (papilom, vakuola), rodu *Papillomavirus*. Drugi rod ove obitelji virusa su *Polyomavirusi*. HPV je mali, 45-60 nm u promjeru; uobičajeni su u prirodi i inficiraju većinu sisavaca ali i mnoge druge vrste životinja. Genom virusa je dvolančana, kružna molekula DNA, veličine 7.800 do 7.900 parova baza. Kapsida je oblika ikozaedra, a sastoji se od 72 kapsomere. Ne sadrže lipide i ugljikohidrate; otporna je na eter, kiseline i toplinu.

Papovavirusi su patogeni samo za jednu vrstu domaćina; ili čovjeka ili životinju. U svojim prirodnim domaćinima uzrokuju kronične latentne infekcije. Umnožavaju se u staničnoj jezgri. Na zaražene stanice djeluju različito, pa ovisno o vrsti stanica mogu uzrokovati lizu

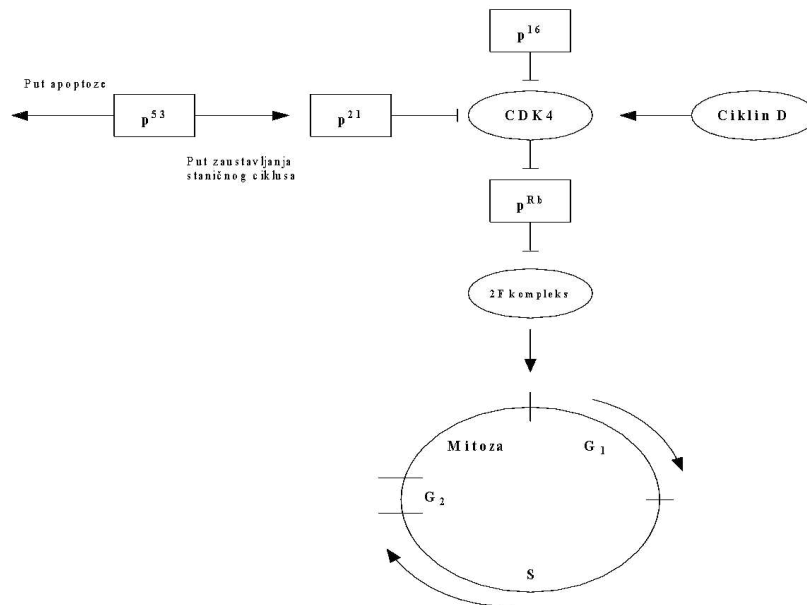
stanica, vakuolizaciju citoplazme, transformaciju stanica i tvorbu tumora (slika 4). U stanicama primljivim za viruse omogućuju litičko umnažanje virusa. U neprimljivim stanicama virusni proteini mogu onkogeno transformirati stanice.

Genom virusa dijeli se na tri područja: područje L (od engl. *late*) sadrži gene koji kodiraju proteine kapside virusa; područje E (od engl. *early*) nosi gene koji kodiraju proteine odgovorne za razmnožavanje virusa i transformaciju (onkogeni učinak) stanice; područje R (od engl. *regulatory*) nosi gene koji kodiraju regulacijske proteine i upravljaju procesima umnažanja virusa (slika 5). Transformacija stanice odgovorna je za onkogeni učinak. Za sada je poznato je 7-8 ovisno o virusu) ranih gena (*E1-E8*) i isto toliko otvorenih mjesta čitanja ORF (od engl. *open reading frame*) i 2 kasna gena (L1, L2 i dva ORF-mjesta). Gen *L1* kodira tzv. veliki protein kapside, sličan u svim tipovima HPV-a. Gen *L2* kodira mali protein kapside. Ovaj je protein različit u različitim tipovima HPV-a.

U području E geni *E6* i *E7* odgovorni su za zloćudnu preobrazbu nakon infekcije HPV-om. Ovo je osobito izraženo u genotipovima HPV-a 16 i 18. Drži se izglednim kako je onkogeno djelovanje virusa posljedica vezanja njihovih proteina E6 i E7 na tumor supresor gene p53 i RB; posljedica je inaktivacija tumor supresor gena, što je ključni trenutak u zloćudnoj preobrazbi stanica. Temeljna aktivnost virusnog proteina E5 jest mitogena stimulacija epitelnih stanica čovjeka. Umnažanje HPV-a kontrolirani je slijed zbivanja koja ovisi o (ne)prisustvu određenih virusnih proteina te zrelosti epitelnih stanica domaćina.

Početak infekcije je uvijek u stanicama bazalnog sloja, gdje episomalni oblik virusa uzrokuje latentnu infekciju. Tvorba tumora zbiva se u tri stupnja: u prvom stupnju stanicu inficira HPV; u drugom stupnju, uz prisutni HPV, važnu ulogu imaju kancerogene tvari (cigaretni dim, ultraljubičaste zrake, zračenje, kemijski čimbenici i dr.); u trećem stupnju ugrađuje se virusna

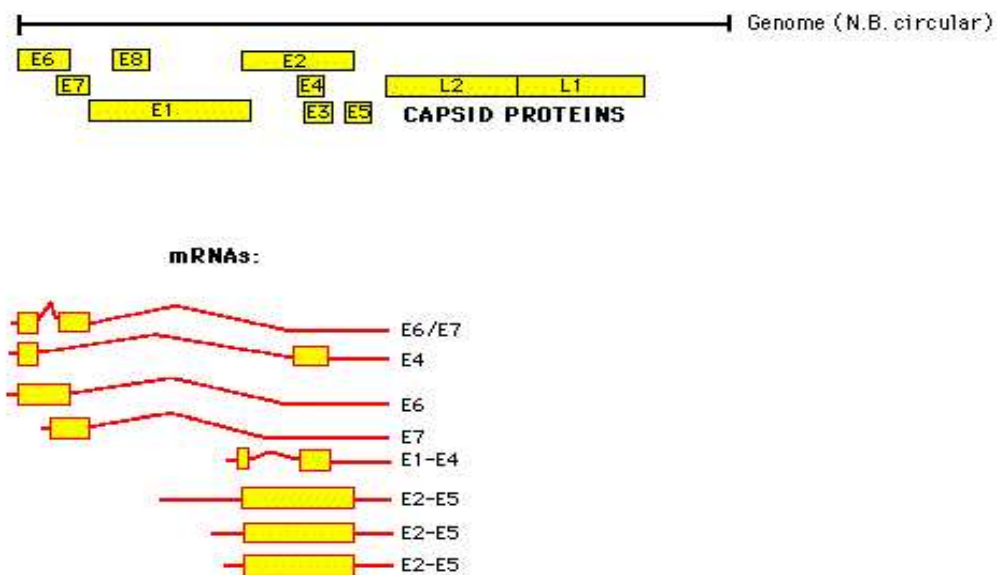
DNA u DNA stanice domaćina. U dobroćudnim tumorima su mnogobrojne kopije virusne DNA prisutne u episomalnom obliku. U zloćudnim je tumorima virusna DNA uvijek ugrađena u genom stanice domaćina.



Slika 4. Shema staničnog ciklusa u koji se uključuje protein E6 (p53) i čimbenik transkripcije HPV (pRB)

Virusni se genom prije ugradnje u genom stanice uvijek najprije otvori, a potom izravna. Prekid genoma nastaje u području E2. Područje E2 ima zapis za proteine koji inhibiraju aktivnost prepisivanja područja E6 i E7. Posljedica fizičkog prekidanja E2 gena jest gomilanje virusnih proteina E6 i E7 u inficiranoj stanici. Nagomilani proteini E6 i E7 spajaju se na proteine tumorsupresorskih gena, *p53* i *RB*. Posljedica takvih spajanja jest inaktivacija aktivnost tumorsupresorskih protein, nakon čega slijedi nekontrolirani rast stanice, odnosno tvorba tumora. Dakle, temeljne značajke tumorogeneze i infekcije HPV-om jesu: 1) tumor se stvara samo uz neke tipove virusa, 2) vremenski razmak od početka nastanka infekcije HPV-om pa do tvorbe

tumora običn je dug, i 3) mora postojati sinergistički učinak HPV-a s drugim karcinogenim čimbenicima. Do sada je identificirano oko 75 različitih HPV tipova (tablica 4).



Slika 5. Shematski prikaz genoma HPV-a

Različiti tipovi HPV-a uzrokuju bolest na različitim predilekcijskim tkivima u organizmu. Više od pola ih je identificirano u spolnom sustavu (41). To je najčešća spolno prenosive bolest. Infekcija je najčešća u mladosti, smatra se da je inficirano oko 10% djece. Prenosi se bliskim dodirrom sa zaraženom osobom, a ulaze u organizam kroz oštećenu kožu, preko sluznice pri spolnom odnosu (genitalne bradavice).

Danas se, osim karcinoma prekanceroze grlića maternice, navodi i mogućnost pojave gubitka trudnoće zbog prisustva i/ili infekcije nekim tipovima HPV-a (58, 59). Viđene su neonatalne infekcije tipovima 16 i 18, dok su većina kondilomata akuminata (genitalne bradavice) u djece uzrokovani tipovima 6 i 11. Pojava ovih tipova HPV-a povezuje se s pojavom karcinoma anogenitalnog područja u djece (60). Vrlo rijetko se spominju kao uzročnici spontanih

pobačaja, iako postoje potvrde o visokoj učestalosti HPV DNA (HPV 6, 11, 16, 18, 33 i 51) u patohistološkom materijalu ranih pobačaja. Nađeni su u spermi kod 64,3% ispitivanih bolesnika (61).

Tablica 4. Svrstavanje danas poznatih HPV genotipova u skupine na temelju sukladnosti njihovih nukleotidnih nizova.

SKUPINA 1. HPV izdvojen u bolesnika s bradavičastom epidermodisplazijom (30% planocelularni karcinom), najvažniji genotipovi: 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19 – 25, 36, 46, 47 i 50.
SKUPINA 2. HPV izdvojen iz dobroćudnih i zloćudnih novotvorina (tzv. kožni genotipovi), najvažniji genotipovi: 1 – 4, 10, 26 – 29, 37, 38, 41, 48 i 49.
SKUPINA 3. HPV izdvojeni iz hiperplastičnih promjena i epitelnih dobroćudnih i zloćudnih novotvorina (tzv. sluznični ili anogenitalni genotipovi), najvažniji genotipovi: 6, 11, 13, 16, 18, 30 – 35, 39, 40, 42 – 45 i 51 – 69. <i>Rizičnost genotipova skupine 3:</i> <i>Visokorizični:</i> 16, 18, 31, 45, 46 (intraepitelne neoplazije vrata maternice i planocelularni karcinom vrata maternice). <i>Granično rizični:</i> 33, 35, 39, 41, 52, 58, 59, 68. <i>Niskorizični:</i> 6, 11, 42 – 44 i 53 – 55 (dobroćudni tumori pločastog epitela, šiljasti kondilomi, planocelularni karcinomi).

*Preuzeto iz: Presečki V i sur. Virologija. Medicinska naklada, Zagreb, str. 131, 2002.

Amerikanci su 1998. ispitivanjem uzoraka tkiva spontanih pobačaja neposredno uklopljenih u parafin dokazali prisutnost genoma HPV 16. U tom ispitivanju otkriveno je da je ciljno mjesto za HPV sinciciotrofoblast. Zbog toga je postavljena hipoteza da infekcija trofoblasta HPV-om stvara promjene koje kompromitiraju trudnoću (58, 59).

1. 4. POSTELJICA

Posteljica ili placenta (od gr. *plakous*: plosnati kolač) je privremeni organ koji traje koliko i trudnoća. Jedini je organ čovjekova tijela koji sjedinjuje tkiva dviju osoba. *Pars fetalis* je dio koji pripada fetusu, a *pars materna* tkivu majke. Funkcija posteljice je višestruka: nutritivno –

respiracijska, ekskrecijska i imunosna. Glavni sustav tkivne prepoznatljivosti (MHC) igra dominantnu ulogu u prepoznavanju i razlikovanju vlastitih od stranih antigena. Odgovor glavnog sustava tkivne prepoznatljivosti olakšava preživljavanje fetusa.

Upale ovojnice ploda i posteljice mogu nastati na jedan od sljedećih načina: ascenzijom uzročnika iz rodnice ili vrata maternice, širenjem mikroorganizama iz krvotoka majke u krvotok ploda, neposrednim širenjem uzročnika iz žarišta infekcije u jajovodu ili u zdjelici, unošenjem uzročnika u amnijsku šupljinu prilikom dijagnostičkog ili terapijskog zahvata, oplodnjom jajne stanice već zaraženim spermijem.

Pobačaj između 20. i 22. tjedna gestacije donja je granica preživljavanja ploda. Spontani je pobačaj prekid trudnoće do kojeg je došlo bez upotrebe lijekova ili mehaničkih sredstava. Ako se spontani pobačaj ponovi tri puta naziva se *abortus habitualis*. Ovisno o tome jesu li svi produkti trudnoće izbačeni iz maternice pobačaj se dijeli na potpuni (*ab. completus*) i nepotpuni (*ab. incompletus*). *Abortus retentus*, nazvan i *missed abortion*, nastaje kada se mrtvi plod zadrži u maternici. Učestalost spontanih pobačaja je visoka. Drži se da je smrtnost zametaka najveća u prvim tjednima trudnoće te da od svih oplodjenih jajašaca samo oko 50% preživljava do implantacije. Nakon implantacije, u prvom i drugom tromjesečju trudnoće, učestalost spontanih pobačaja iznosi 15 do 25%. Uzroci spontanih pobačaja vrlo su različiti. Podjele spontanih pobačaja različite su jer se temelje na različitim parametrima. To su, primjerice, trajanje trudnoće, pobačeni materijal te njegov makroskopski i histološki izgled. S obzirom na gestacijsku dob i stupanj razvoja zametka, pobačaji se još dijele na rane i kasne. Rani pobačaj nastupi do kraja 8. tjedna gestacije/amenoreje, dakle u doba kad se zametak naziva embrijem. Kasni pobačaj se događa od početka 9. tjedna gestacije do postavljene granice preživljenja, u doba koje odgovara fetalnom stadiju razvoja.

Cjelokupni materijal ranog spontanog pobačaja sastoji se od korijalne vreće, decidue i krvnih ugrušaka. Korijalna vreća može biti cijela i sadržavati embrio. Posteljično tkivo kod ranog pobačaja najčešće pokazuje samo nezrelu građu primjerenu dobi, no u ovisnosti o vremenu proteklom od intrauterine smrti embrija do samog pobačaja, mogu se uočiti određene promjene. To je prvenstveno hidropska degeneracija resica posteljice (*degeneratio hydropica placentae*) - resice su edematozne, avaskularne te obložene tankim spljoštenim trofoblastom. Ta se promjena obično viđa prilikom rane smrti embrija. U tkivu posteljice nađe se fibrozirana stroma i sklerozirane žile što nastaje zbog smrti ploda. Ako prevladava hidropska degeneracija resica, za pretpostaviti je kako je smrt zametka nastupila vrlo rano, najvjerojatnije zbog abnormalnosti kromosoma. Uz nalaz posteljičnih resica uredne građe pretpostavlja se da je smrt ploda nastupila poradi čimbenika okoliša, imunskih razloga, malformacija maternice i sl. Nalaz stromalne fibroze resica i skleroze krvnih žila sugerira smrt ploda kao uzrok, a ne čimbenike okoliša, premda je to manje sigurno nego kod hidropski promijenjene posteljice. U kasnog spontanog pobačaja abnormalnosti kromosoma su rjeđe i nađu se u 5-10% slučajeva (62, 63).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Uzroci spontanih pobačaja su vrlo različiti: mogu biti genetske, infektivne, anatomske, endokrine, imunološke i idiopatske etiologije. Aberacije kromosoma i virusne infekcije, posebice one nastale neposredno ili tijekom ranog razdoblja trudnoće, na prvom su mjestu od brojnih mogućih uzroka pobačaja. Preranom prekidu trudnoće, uz navedene uzroke, doprinose i različiti vanjski čimbenici kao što su primjerice neprimjereni radni uvjeti (izloženost zračenju, štetnim kemikalijama i slično) i nezdrave životne navike (konzumiranja alkohola i kave, pušenje itd). Stoga smo pretpostavili da su za nastanak promjena kromosoma, koje dovode do spontanog pobačaja, potrebne dvije promjene koje se dogode tijekom mejoze i/ili postfertilizacijske mitoze. Također smo pretpostavili da je prva promjena infekcija i prisutnost HPV-a, a druge promjene su prethodne infekcije roditelja s virusima koji mogu utjecati na stanični ciklus i izloženost drugim mutagenim čimbenicima iz okoliša.

Da bismo potvrdili ili odbacili postavljene hipoteze, postavili smo slijedeće ciljeve rada:

1. Postojanje aneuploidije, tj. količinu DNK u pobačenom tkivu ispitat ćemo protočnom citometrijom.
2. Ispitati postavljenu hipotezu da su dvije promjene tijekom mejoze i/ili postfertilizacijske mitoze odgovorne za nastanak novih promjena kromosoma, što pak rezultira spontanom pobačajem.
3. Utvrditi ulogu infekcije žene HPV-om kao prve promjene (udarca).
4. Utvrditi ulogu infekcije roditelja s virusima rubela, CMV, EBV, HSV-1, HSV-2 i Parvo-B19 kao druge promjene (udarca).
5. Dokazati ulogu mutagenih čimbenika iz okoliša (pušenje, alkohol, droge, zračenje, kemikalije) i bolesti u široj i užoj obitelji, kao druge promjene (udarca) koja

dovodi do pojave nerazdvajanja u spontanih pobačaja.

6. Utvrditi povezanost «prvog i drugog udarca» s preranim prekidom trudnoće.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

3. 1. ISPITANICI

Istraživanje je obavljeno u Genetskom savjetovalištu i Laboratoriju za humanu genetiku Klinike za dječje bolesti KBC Split.

Provedena je retrospektivna analiza podataka skupljenih tijekom razdoblja od 1985. do 2001. godine, za više od 500 bračnih parova koji su došli na genetsko ispitivanje zbog jednog ili više spontanih pobačaja u razdoblju od 1 do 3 godine.

Za 405 bračnih parova nađeni su podaci prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Prikaz broja parova prema godinama kako su prvi put dolazili u Genetsko savjetovalište

Godina	Broj parova (N)	Broj parova (%)
1985.	3	0,77
1986.	4	0,99
1987.	8	1,98
1988.	13	3,21
1989.	16	3,95
1990.	17	4,20
1991.	22	5,43
1992.	23	5,68
1993.	8	1,98
1994.	28	6,92
1995.	22	5,43
1996.	23	5,43
1997.	31	7,66
1998.	43	10,62
1999.	42	10,37
2000.	58	14,33
2001.	44	10,86
Ukupno	405	100,00

U ispitivanje smo uključili parove u kojih se spontani pobačaj dogodio do 16. tjedna trudnoće, tj. njih ukupno 258.

U tablici 6 vidi se učestalost prvog posjeta prema godinama, od 1985. do 2001. godine.

Tablica 6. Prikaz broja parova uključenih u istraživanje prema godinama prvog dolaska u Genetsko savjetovalište, uz uvjet najmanje jednog pobačaja do 16. tjedna trudnoće

Godina	Broj parova (N)	Broj parova (%)
1987.	3	1,16
1988.	4	1,55
1989.	10	3,87
1990.	10	3,87
1991.	13	5,04
1992.	22	8,53
1993.	6	2,32
1994.	18	6,98
1995.	14	5,43
1996.	14	5,43
1997.	10	3,88
1998.	30	11,63
1999.	21	8,14
2000.	39	15,12
2001.	44	17,05
Ukupno	258	100,00

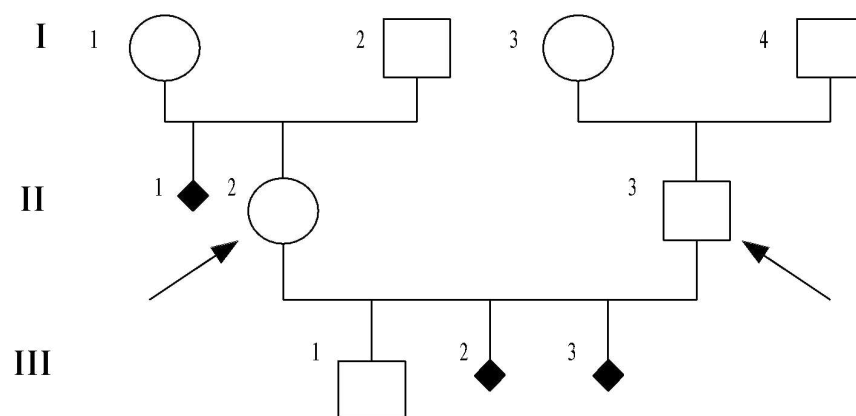
3. 2. POSTUPCI

3. 2. 1. Informacijski razgovor

Tijekom razgovora s ispitanicima (258 bračnih parova, tj. 258 muškaraca i 258 žena) u Genetskom savjetovalištu prikupljeni su podaci o: mjestu stanovanja, dobi, zanimanju, stručnoj spremi, vrsti posla, životnim navikama, eventualnom uživanju alkohola, duhana i droge, prethodnim trudnoćama, spontanim pobačajima, mrtvorodenima, bolestima u užoj i široj obitelji, nasljednim bolestima i bolestima roditelja prije i u prvim tjednima neuspjele trudnoće, krvnom srodstvu te eventualnoj izloženosti neuobičajenim, štetnim kemikalijama u kući ili na poslu.

Slika 6 prikazuje obiteljsko stablo koje smo za pojedine obitelji načinili temeljem

podataka skupljenih tijekom informacijskog razgovora.



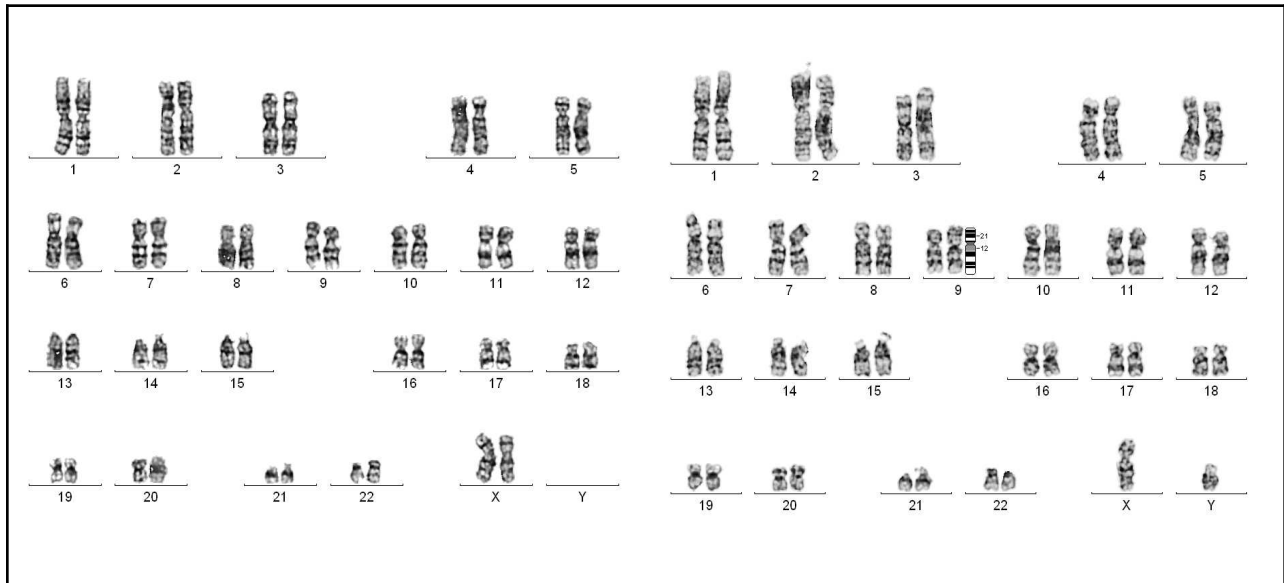
Slika 6. Prikaz obiteljskog stabla. Krug - ženski spol, kvadrat - muški spol, ispunjeni romb - spontani pobačaj, ispunjen kvadrat ili krug - bolesnik s nekom nasljednom bolešću. Strelica označava osobu od koje je započeto crtanje obiteljskog stabla (propositus). Rimski brojevi označavaju generaciju članova obitelji, a arapski brojevi pojedine članove obitelji.
- II/2 i II/3 bračni par sa spontanim pobačajima
- II/1 spontani pobačaj u obitelji supruge

3. 2. 2. Kariotipizacija – GTG-analiza kromosoma

Ova je analiza provedena na limfocitima periferne krvi kod svih ispitanika uključenih u ispitivanje. U ispitivanje je uključeno 258 bračnih parova. Iz uzorka periferne krvi partnera priređena je kratkotrajna kultura stanica za 463 uzorka ispitanika (231 žena i 232 muškarca) i 40 uzoraka kontrolne skupine (20 žena i 20 muškaraca), ukupno 503 uzorka. Uzorak pune krvi od 2 ml uzet je iz vene sterilnom iglom/špricom prethodno ispranom s 0,2 ml heparina. Krv je stavljena u Euroclon Chromosome kit P s hranjivom podlogom, u kojoj se nalazilo i 10% seruma fetusa goveda, L-glutamin, gentamicin, HEPES, heparin, interleukin i PHA (*Phytohaemagglutinine*). Stanice su uzgajane 2 dana na temperaturi od 37°C u atmosferi uz dodatak 5% CO₂. Prije daljnjeg procesiranja u stanice su dodane 2 kapi kolhicina koji zaustavlja

stvaranje mikrotubula diobenog vretena te tako zaustavlja i mitozu stanica i omogućuje skupljanje dovoljnog broja stanica s kromosomima u profazi – prometafazi. Poslije centrifugiranja na 2000 rpm (Juan, Francuska) 3-4 minute, na talog stanica je postupno, tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi, dodana hipotonična otopina 0,075 M KCl (volumen ovisi o veličini taloga stanica). Reakcija lize stanica prekinuta je dodavanjem fiksativa (Ibrahimova otopina – 3 ml metanola i 5ml ledene octene kiseline u 92 ml destilirane vode) u količini od 5 ml. Suspenzije su centrifugirane na 2000 rpm (Juan, Francuska). Dobiveni talog je nakon drugog ili trećeg centrifugiranja, kad je postignuta zadovoljavajuća čistoća, prenesen na predmetno stakalce Pasteurovom pipetom. Da bi se dobio ravnomjerni raspored mitozna na stakalcu, kapljica je puhanjem raspršena uzduž stakalca. Tako dobiveni nativni preparati uranjani su u tripsin i zatim bojani Giemsinom otopinom. Isprugani kromosomi (oko 400 pruga) analizirani su s obzirom na broj i strukturu kromosoma svjetlosnim mikroskopom s imerzijskim objektivom. Fotografirani su automatskom kamerom i po razvijanju filma kromosomi su izrezani iz fotografije i složeni u kariogram za ispitanike, ili su kariogrami složeni pomoću softvera Meta sustava automatske kompjuterske kariotipizacije za kontrolnu skupinu (slike 7). Kromosomi su svrstani u homologne parove, i to prema međusobnoj sličnosti u dužini te položaju primarne konstrikcije (centromere). Autosomi se razlikuju po broju (1-22) i grupi (A-G) kojoj pripadaju. Skup svih kromosoma podrijetlom iz jedne jezgre čini kariogram. Analizom kromosoma većeg broja stanica određujemo kromosomsku legitimaciju čovjeka, tzv. kariotip. On je predstavljen formulom koja daje i citogenetičku dijagnozu, a sadržava broj kromosoma, kromosomski spol, te u slučaju kromosomske abnormalnosti dodatne podatke koji definiraju promjenu. Kromosomski polimorfizam ili heteromorfizam je strukturna varijanta kromosoma koja je široko rasprostranjena u humanoj populaciji i uglavom nema efekta na fenotip, i onda kada je u vrlo snažno izraženoj formi. Taj polimorfizam predstavlja konstitutivni heterokromatin, koji je često

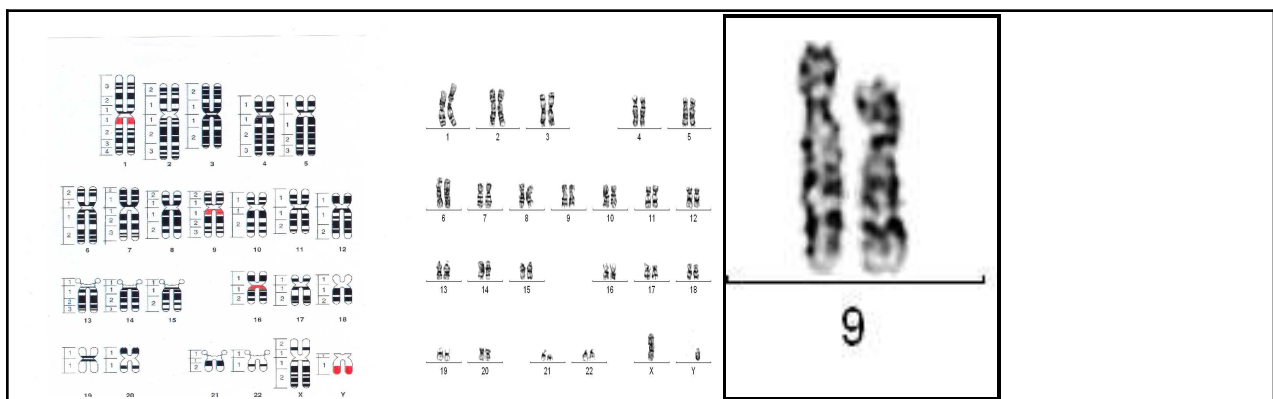
smješten u centromeričnoj regiji kromosoma (slika 7 i 8). Polimorfični segmenti variraju u veličini, poziciji (kroz inverzije) i sposobnosti primanja boje u kromosomima broj:1, 9, 16 i Y ali također neke varijante su prisutne i kod drugih kromosoma kao: 12, 17 i 21. Uz to što variraju u veličini, heterokromatične regije su sposobne stvarati druge strukturne aberacije. Mnoga fragilna mjesta su odraz kromosomskog polimorfizma (1, 66, 67).



46,XX (uredan ženski kariotip)

46,XY, per inv 9 (uredan muški kariotip s varijacijom u populaciji pericentričnom inverzijom devetog kromosoma)

Slika. 7. Primjer urednog kariograma žene (46,XX) i muškarca (46,XY, per inv 9) s varijacijom u populaciji per inv (9)(p12;q13).





Slika. 8. Idiogram s crveno označenim područjima heterokromatina na 1, 9 i 16 kromosomu i Yq i primjeri: 1qh+, 9qh+, 21s+ (povećani sateliti na 21 kromosomu).

3. 2. 3. Ispitivanje sadržaja DNA u patohistološkom materijalu spontanog pobačaja metodom protočne citometrije

Materijal spontanog pobačaja za ispitivanje sadržaja DNA, izolaciju DNA i hibridizaciju *in situ* preuzet je iz arhive Zavoda za patologiju KBC Split. Riječ je o materijalu fiksiranom formalinom i uklopljenom u parafin (tzv. parafinske kocke). Podaci o patohistološkim nalazima tih uzoraka dobiveni su tijekom informacijskog razgovora u Genetskom savjetovalištu Klinike za dječje bolesti, KBC Split. Većina ispitanika bila je iz KBC Split, Klinike za ženske bolesti i porode, i drugih ginekoloških ambulanti u Splitu, a jedan dio ispitanika bio je iz drugih ginekoloških odjela ili ambulanti iz područja Splitsko - dalmatinske, Šibensko - kninske, Zadarske, Dubrovačko - neretvanske županije i iz BiH.

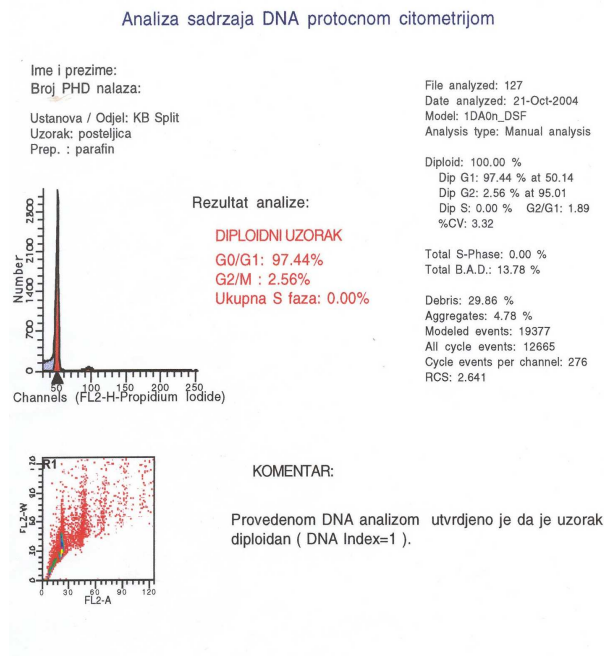
Sadržaj DNA (odražava stanje broja kromosoma, ploidnost) u uzorcima ispitan je protočnim citometrom (FACScan, Becton-Dickinson, San Jose, CA, SAD). Normalne stanice, koje nisu u diobi već u G_0/G_1 fazi staničnog ciklusa, imaju normalan, diploidni broj (2n) kromosoma (DNA). Na kraju S-faze staničnog ciklusa, zbog netom završene replikacije DNA, količina se kromosoma (DNA) udvostručuje (4n). Aneuploidija se ovom metodom vidi kao promjena količine DNA. Metoda protočne citometrije je najbolja za retrospektivna ispitivanja na

pobačenom materijalu. U sustavu protočnog citometra veliki broj stanica u jednom nizu protiče kroz laserski snop, pa se tako svaka može pojedinačno ispitati. Ako su stanice vezane uz fluorescentne molekule, fluorokrom će prolazno apsorbirati lasersko svjetlo i zatim emitirati u drugoj svjetlosnoj frekvenciji. Protočni citometar je opremljen detektorima za emitiranu svjetlost, koji ne samo da otkriva fluorescentni signal, već i određuje njegovu jačinu. Jačina emitiranog svjetla izravno je proporcionalna količini fluorescentne tvari vezane u stanici. Propidij jodid je fluorokrom koji se najčešće upotrebljava u ovoj analizi. On se vezuje za DNA u stehiometrijskom odnosu i to u svim stadijima staničnog ciklusa a jačina, kojom stanična jezgra emitira svjetlost, izravno je proporcionalna sadržaju DNA.

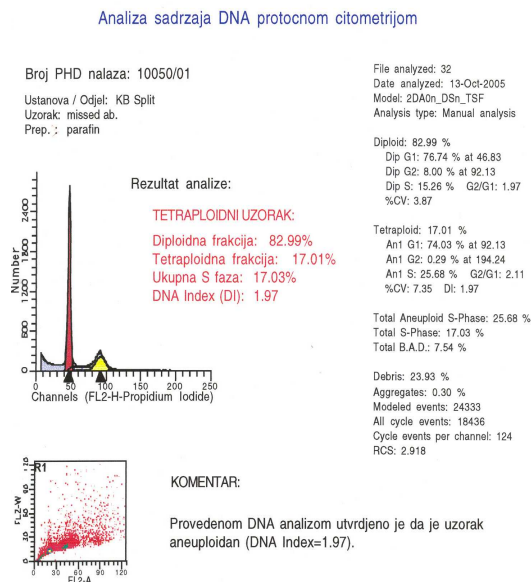
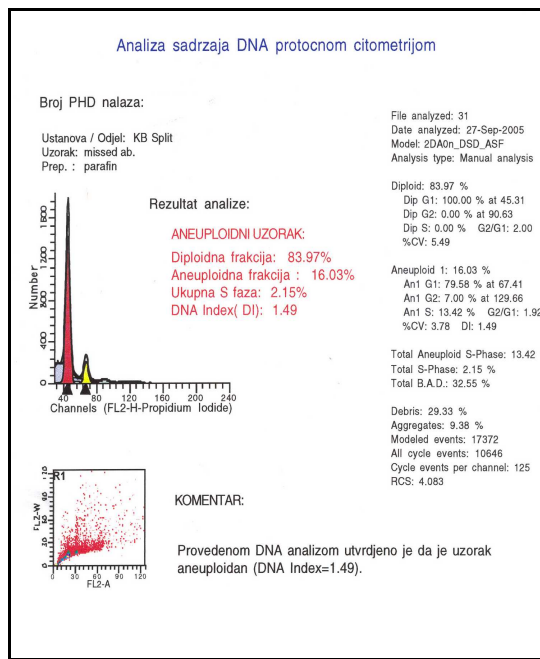
Prije analize protočnim citometrom uzorci pobačenog materijala, prethodno fiksirani u 10%-tnom formalinu i uklopljeni u parafin, izrezani su mikrotomom na tanke rezove (50 μm). Za analizu protočnim citometrom upotrebljena su dva reza, a rez prije i poslije obojeni su hematoksilin-eozinom. Na njima je provjereno nalazi li se na srednjim rezovima željeno tkivo. Rezovi se deparafiniraju u ksilolu, rehidriraju uranjanjem u alkohol sve nižih koncentracija i konačno u destiliranu vodu. Zatim se tkivo stavlja u otopinu za digestiju (0,5% pepsin otopljenim u 0,9% NaCl, pH 1,5) (60 minuta, 37°C). Tako su dobivene suspenzije jezgara, a agregati jezgara odstranjeni su filtriranjem kroz najlonski filter od 41 mm. Zatim se suspenzije centrifugiraju i ispiru u otopini fosfatnog pufera (PBS). Nakon toga se dodaje RNAza (200 μL) tijekom 10 minuta (uklanja se RNA). Potom su jezgre obojene propidij jodidom (10 minuta). Prije analize uzorci su inkubirani u tami 2-24 sata na +4°C. Nakon propuštanja uzoraka analizira se histogram DNA uz pomoć programa Modfit 3.0 (Verity Software House, Inc.). Intenzitet obojenosti izravno je proporcionalan sadržaju DNA pojedine stanice, a prikazuju se krivuljom kojom se iskazuje postotak stanica u G_0/G_1 (2N), S (4N ili između 2N i 4N, ako S faza nije završena), G_2 (4N) i M

fazi staničnog ciklusa.

Tkivo s jednim G_0/G_1 vrškom se u DNA-histogramu definira kao diploidno, za razliku od aneuploidnog za koje je, osim već spomenutog vrška, karakterističan i dodatni, odvojeni G_0/G_1 vršak (s više od 10% jezgara). Sadržaj DNA izražen je kao relativna vrijednost u odnosu na stanice standarda i prikazan kao DNA index (DI). Za diploidni uzorak DI iznosi 1.0. Koeficijent varijacije (CV, standardna devijacija u odnosu na srednju vrijednost) računa se na G_0/G_1 diploidnom vršku, uz gornji prihvatljivi iznos od 8%.



Slika 9. Diploidni uzorak



Slika 10. Aneuploidni i tetraploidni uzorak

3. 2. 4. Izolacija DNA iz parafinskih rezova tkiva

Rezovi tkiva stavljeni su u epruvete od 1, 5 ml u koje je dodan 1 ml ksilola. Rezovi su tako ostavljeni 30 minuta na sobnoj temperaturi. Tijekom tog razdoblja epruvete su protresane svakih 10 minuta po nekoliko puta; time je omogućen bolji dodir ksilola i tkiva. Ksilol i ostaci parafina odvojeni su od tkiva centrifugiranjem 3 do 5 minuta u mikrocentrifugi na punoj brzini. Nakon toga je tkivo isprano u 0, 5 ml 100% alkohola. Alkohol je odstranjen centrifugiranjem (3 do 5 minuta u mikrocentrifugi na punoj brzini). Još jednom je ponovljeno ispiranje alkoholom. Uzorci su osušeni u sušioniku. Na osušene uzorke dodano je 30 µl pufera za digestiju (1 M Tris, pH 7,5, 0,5 M EDTA, 5 M NaCl) i 1 µl proteinaze K (koncentracije 20 mg/ml). Uzorci su inkubirani 48 sati na 55°C. Nakon inkubacije centrifugirani su 2 do 3 sekunde; odvojen je supernatant. Aktivnost proteinaze

dokinuta je grijanjem uzoraka na 90° do 100°C, u trajanju od 5 do 10 minuta. Potom je na uzorke

dodana 1/3 volumena zasićenog NaCl. Uzorci su snažno protreseni i centrifugirani 15 minuta na 11000 g. Na supernatant, prenesen u čistu epruvetu, dodano je 2 do 3 volumena apsolutnog alkohola. Uzorci su promiješani okretanjem epruveta, ostavljeni u zamrzivaču na -20°C najmanje 30 minuta, a potom su centrifugirani na 11000 g. Nakon odstranjenja alkohola talog DNA otopljen je u 50 ili 100 µl ddH₂O (ovisno o volumenu taloga) i to na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata ili u hladnjaku preko noći.

Kvaliteta izolirane DNA provjerena je elektroforezom u 1, 5% gelu agaroze u puferu TBE (0,45 mM Tris-borat; 0,01 M Na₂EDTA) uz 6V/cm.

3. 2. 5. Metoda lančane reakcije polimerazom - PCR

Nakon izolacije DNA, a prije umnažanja uzoraka za HPV specifičnim početnicama, provedena je reakcija PCR početnicama za globin PC04 i GH20. Ukoliko je u uzorku dobiven karakteristični odsječak dužine 268 pb nastavljene su reakcije PCR za dokazivanje genoma HPV-a. Prisutnost genoma virusa dokazivana je upotrebom tri para početnica (*consensus* početnice) kojima se dokazuje većina tipova HPV-a. To su: My09/My11, CPI/CPII G i Gp5/6+. Osim toga, svaki je uzorak ispitan i s početnicama specifičnim za pojedine tipove virusa: HPV-6/11, 16, 18 i 33.

Reakcija PCR provedena je u ukupnom volumenu od 20 µM. Reakcijska smjesa sadržavala je: pufer za PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3 bez MgCl₂ za reakcije s *consensus* početnicama, Promega, SAD i isti pufer s MgCl₂ za reakcije sa specifičnim početnicama, TaKaRa, Japan), 1,5 mM MgCl₂ (za reakcije u puferu koji ga ne sadrži), 200 µM svakog dNTP za reakcije s *consensus* početnicama i 100 µM svakog dNTP za reakcije s HPV specifičnim tipom početnica i 1 µM svake *consensus* početnice, odnosno 20 µM specifičnih

početnica. Izuzetak su reakcijske smjese s početnicama My09/My11 i HPV-33 u kojima se koristi 2 μ M koncentracija $MgCl_2$, te smjesa s početnicama HPV-6/11 u koje je stavljan 1 μ M $MgCl_2$ i 100 μ M dNTP-a. U reakcije je stavljan oko 200 ng DNA i 2U Taq DNA polimeraze (Promega).

Za visokorizične tipove HPV-a rabljene su početnice HPVpU-1M i HPVpU-2R, a za niskorizične tipove početnice HPVpU-31B i HPVpU-2R. Reakcija PCR provedena je i za uzorak kontrolne DNA (HPV-TM za visokorizične genotipove, veličine 63 pb i HPV-TB-za niskorizične genotipove, veličine 61 pb), proizvođača TaKaRa.

Uvjeti reakcije PCR: 94°C/5 minute; 94°C/30 sekundi; 55°C/2 minute; 72°C/2 minute; 30 ciklusa; 72°C/7 minuta.

Reakcije PCR načinjene su u aparatu za PCR (Gene Amp, PCR System 9700, PE Applied Biosystems, Foster City, SAD).

Provjera dobivenih rezultata umnažanja načinjena je elektroforezom u 3% gelu agaroze, u puferu 1xTBE (10x: 89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA, pH 8,0), uz 6V/cm. Dobiveni fragmenti nalaze se u rasponu 228-268 pb.

3. 2. 6. Hibridizacija *in situ*

U metodi neradioaktivne hibridizacije *in situ* primjenjuje se DAKO GenPoint CSA sustav u kombinaciji s biotiniliranim sondama HPV-6/11, 16/18, 31/33/51 (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, SAD).

Prethodno pripremljeni rezovi tkiva debljine 5 μ m stavljeni su na silanizirano predmetno stakalce. Posebno je važno da su rezovi dobro osušeni i pričvršćeni, zbog agresivnih tretmana kemikalijama i izloženosti različitim temperaturama. Nakon 30 minuta na 60°C, stakalca su redom uranjana u ksilen, 100% alkohol, 95% alkohol i destiliranu vodu. Tako su

uzorci deparafinirani i rehidrirani. Potom su inkubirani u 0,8%-tnoj otopini pepsina (u 0,2 N HCl), 5-10 minuta na 37°C, te isprani tri puta u destiliranoj vodi. Zatim su inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi u puferu PK (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 ml mM EDTA; 50 µg/ml proteinaze K), isprani u destiliranoj vodi, inkubirani 20 minuta na sobnoj temperaturi u 0,3% vodikovom peroksidu (razrijeđen u metanolu), te ponovno isprani u destiliranoj vodi. Na talog uzorka, bez destilirane vode, stavljeno je 15 µl probe HPV-6/11, 16/18, 31/33/51 (Enzo, NY, SAD). Uzorci su pokriveni pokrovnica i denaturirani na ploči za zagrijavanje u trajanju od 5 minuta na 90°C. Nakon toga je slijedila hibridizacija u vlažnoj komori tijekom 60 minuta na 37°C. Stakalca su potom uranjana u Tris-HCl pufer (20 mM, pH 7,5; 1% Tween 20) tijekom 5-10 minuta (odstranjenje pokrovnica). Slijedila je inkubacija od 20 minuta, u tzv. “stringent wash” otopini (0,1 x SSC; 20 x SSC 3M NaCl; 0,3 M natrijev citrat) na 55°C. Za umnažanje signala stakalca su inkubirana tijekom 5 minuta u svježoj otopini TBS (500 mM NaCl; 20 mM Tris; pH 7,5). Višak pufera je pažljivo obrisan, nakon čega je slijedila inkubacija u amplifikacijskim reagensima. To su: primarna na streptavidin vezana peroksidaza razrijeđena 1:800, biotini-tiramid i sekundarna streptavidin-peroksidaza. Svaka je inkubacija trajala 15 minuta (sobna temperatura). Iza svakog od navedenih reagensa uzorci su isprani tri puta po 5 minuta u TBST-u (Tris-HCl pufer; 0,2% Tween 20; pH 7,6). Kao kromogeni indikator rabljen je diaminobenzidin (DAB) koji oksidacijom s peroksidazama, stvara tamnosmeđe točke na mjestima hibridizacije. DAB je razrijeđen Tris-HCl puferom (20 mM Tris-HCl) u omjeru 1:50 neposredno prije upotrebe. Nastajanje signala zaustavljano je ispiranjem uzoraka u vodi tijekom 5 minuta. Potom su uzorci obojani Mayer-ovim hematoksilinom (10-15 sekundi) – jezgre stanica boji plavo. Reakcija je očitavana svjetlosnim mikroskopom.

3. 2. 7. Statistička obrada podataka

Analiza podataka načinjena je upotrebom analitičkih sustava SPSS for Windows version 13 (SPSS Inc.) i PAST for Windows version 1.68 (PALSTAT). Podaci dobiveni prebrojavanjem prikazani su kao apsolutni brojevi i relativne frekvencije. Podaci dobiveni mjerenjem (dob) prikazani su metodom pet točaka: minimum, prva kvartila, medijan, treća kvartila i maksimum.

Analiza podataka dobivenih prebrojavanjem načinjena je χ^2 testom i Fisherovim egzaktnim testom. Analiza podataka dobivenih mjerenjem načinjena je upotrebom jednosmjerne analize varijance (ANOVA) i Tukeyevog HSD testa. Za postavljenu hipotezu o značajnosti usporedbe dvije vrijednosti koristili smo Z-test. Za usporedbu nekih varijabli u višedimenzionalnim tablicama koristili smo *McNemar Change* test. Svi primijenjeni testovi bili su dvosmjerni. P vrijednosti jednake ili manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim (64, 65).

4. POŠTIVANJE ETIČKIH NAČELA ISTRAŽIVANJA

Tijekom retrospektivne obrade podataka koristili smo se arhivskim uzorcima pobačenog materijala koji su pohranjeni u Zavodu za patologiju KBC Split. Uzorci su analizirani metodama protočne citometrije, PCR i *in situ* hibridizacije. Podaci o osobama, čiji su uzorci korišteni, preuzeti su iz njihovih bolničkih kartona koji se nalaze u Genetskom savjetovalištu Klinike za dječje bolesti KBC Split. Kariotipizacija ovih osoba izvršena je u Laboratoriju za humanu genetiku Klinike za dječje bolesti, KBC Split.

Kontrolnu skupinu sačinjavali su uzorci posteljica zdravih žena nakon normalnog poroda.

Od svake žene i njenog supruga dobivena je pismena suglasnost za uporabu podataka pisanih podataka (bolesnički kartoni) i uzoraka tkiva.

5. REZULTATI

U razdoblju od 1985. do 2001. godine u Genetsko savjetovalište je došlo, zbog jedne ili više neuspjelih trudnoća, 405 bračnih parova. U tablici 5 prikazan je broj parova koji su pojedine kalendarske godine prvi put došli u Genetsko savjetovalište. U genetska istraživanja, od ukupnog broja u uključeno je 258 parova u kojih se barem jedan pobačaj dogodio do, ili u vrijeme 16. tjedna trudnoće. Ovu skupinu ispitanika prikazuje tablica 6. U kontrolnoj skupini je bilo 20 bračnih parova u kojih su žene, bez prethodnih spontanih pobačaja, rodile zdravu djecu. Ispitivani su tijekom 2005. godine.

U tablici 6 u kojoj su parovi sa spontanim pobačajima do 16. tjedna trudnoće, poredani prema godini dolaska u Genetsko savjetovalište, vidi se da je najveći broj ispitanika zatražio genetski savjet zbog neuspjele trudnoće tijekom 2001. godine. Ako ispitivano razdoblje podijelimo u dva, uočljivo je iz tablice 6 kako je tijekom prvog i to desetogodišnjeg razdoblja, od 1987. do kraja 1996. godine, Savjetovalište posjetilo 114 bračnih parova.

Tablica 7. Mjesto stanovanja ispitanika i kontrolnih ispitanika

Mjesto stanovanja	Ispitanici N (%)	Kontrolna skupina N (%)	Ukupno N (%)
Split	121 (46,89)	6 (30)	127 (45,68)
Solin	17 (6,59)	1 (5)	18 (6,47)
Kaštela	13 (5,04)	2 (10)	15 (5,39)
Trogir	15 (5,81)	2 (10)	17 (6,12)
Sinj	18 (6,98)	2 (10)	20 (7,19)
Imotski	14 (5,43)	1 (5)	15 (5,39)
Otoci	9 (3,49)	2 (10)	11 (3,96)
Omiš i Poljica	22 (8,53)	3 (15)	25 (8,99)
ostali gradovi	14 (5,43)	0	14 (5,03)
Bosna i Hercegovina	8 (3,10)	0	8 (2,89)
Nepoznato	7 (2,71)	1 (5)	8 (2,89)
Ukupno	258 (100)	20 (100)	278 (100)

U ukupnom uzorku to predstavlja 44%. Najviše bračnih parova Savjetovalište je posjetilo 1992.

godine, njih 22. U petogodišnjem razdoblju, od 1997. do kraja 2001. godine, genetski su savjet zatražila 144 bračna para. To sačinjava 56% ukupnog ispitivanog uzorka, što je značajno veći broj, ali i značajno veći broj obzirom na kraće ispitivano vremensko razdoblje od 5 godina.

Tablica 7 prikazuje mjesto stanovanja ispitanika i bračnih parova kontrolne skupine. Nije nađena statistički značajna razlika u raspodjeli prema mjestu stanovanja između ispitanika i kontrolne skupine (test za *contingency table*, $p = 0,653$). Najveći broj bračnih parova iz obiju skupina dolazi iz Splita tj. 121 (47%), odnosno 6 (30%).

Tablica 8. Usporedba broja stanovnika i broja bračnih parova sa spontanim pobačajima prema mjestu stanovanja (podaci iz posljednjeg popisa RH)

Mjesto	Broj stanovnika	Broj parova	Postotak %
SPLIT	97556	121	0,124
OMIŠ i POLJICA	13943	22	0,158
IMOTSKI	17174	14	0,080
TROGIR	12566	15	0,119
SOLIN	15177	17	0,112
KAŠTELA	18532	13	0,070
SINJ	23008	18	0,078

Iz tablice 8 uočljivo je kako je u usporedbi s brojem stanovnika iz posljednjeg popisa stanovništva nešto veći broj žena sa spontanim pobačajima došao iz Omiša i područja Poljica.

Tablica 9 prikazuje raspodjelu ispitanika iz obiju skupina prema zanimanju. Nije nađena statistički značajna razlika u raspodjeli zanimanja za žene između ispitanica i kontrolne skupine, dočim je za muškarce uočena statistički značajna razlika.

Sveukupni broj pobačaja prikazan je u tablici 10. Ukupni broj pobačaja zabilježen u ovih 258 bračnih parova iznosio je 574. U 44 bračna para dogodio se jedan pobačaj poslije kojeg su bili upućeni na genetsko ispitivanje. Najveći broj ispitanika imao je 2 spontana pobačaja, njih 155 što je ukupno 310 pobačaja. U skupini s tri pobačaja bilo je 40 ispitanika, što je ukupno 120

pobačaja. Samo 19 ispitanika imalo je 4 i više pobačaja. U toj skupini bilo je ukupno 100 pobačaja.

Tablica 9. Zanimanje ispitanika i osoba iz kontrolne skupine

<i>Zanimanje - žene</i>	Ispitanici N (%)	Kontrolna skupina N (%)
nema podataka	32 (12,41)	0 (0)
krojačica, tekstilna radnica	18 (6,98)	0 (0)
tehničarka, kemijska radnica, kamenoklesarica	40 (15,51)	1 (5)
kuharica, konobarica, ugostiteljska radnica	23 (8,91)	2 (10)
frizerka, kozmetičarka	8 (3,1)	1 (5)
Čistačica	19 (7,36)	1 (5)
medicinska sestra	57 (22,09)	8 (40)
trgovkinja, službenica	60 (23,25)	6 (30)
VSS i studentice	1 (0,39)	1 (5)
<i>Zanimanje - muškarci</i>		
nema podataka	0	1 (5)
niža stručna sprema	20 (7,75)	5 (25)
VSS i studenti	6 (2,32)	5 (25)
SSS, tehničke struke, obrtnici (automehaničar, električar, stolar, pomorac, vozač)	70 (27,13)	0
vojnici, policajci, vojni invalidi, zaposlenici MORH-a ili HV	50 (19,38)	2 (10)
Trgovac	63 (24,43)	0
Službenik	20 (7,75)	2 (10)
konobar, kuhar, pekar, ugostitelj	29 (11,24)	5 (25)

$\chi^2 = 14,03$, $df = 8$, $p = 0,0809$ - za žene – rezultat je rubno statistički neznačajan

$\chi^2 = 57,333$, $df = 6$, $p < 0,0001$ - za muškarce – rezultat je statistički značajan

Tablica 10. Broj spontanih pobačaja po bračnom paru

Broj pobačaja po bračnom paru	Broj parova (%)	Broj pobačaja
1	44 (17,06)	44
2	155 (60,07)	310
3	40 (15,51)	120
4 i više	19 (7,36)	100
Ukupno	258 (100, 00)	574

Dob ispitanika (žene i muškarci) obiju ispitivanih skupina prikazana je u tablici 11.

Tablica 11. Raspodjela svih ispitanika prema dobi

Godine života Žene	Ispitanici N (%)	Kontrolna skupina N (%)
18-22	20 (7,76)	1 (5)
23-27	88 (34,11)	12 (60)
28-35	110 (42,63)	5 (25)
36-41	29 (11,24)	2 (10)
> 41	10 (3,87)	0 (0)
Nema podataka	1 (0,39)	0 (0)
Ukupno	258 (100,00)	20 (100,00)
Muškarci		
18-22	3 (1,16)	0 (0)
23-27	37 (14,34)	2 (10)
28-35	151 (58,53)	12 (60)
36-41	42 (16,28)	2 (10)
> 41	18 (6,98)	3 (15)
Nema podataka	7 (2,71)	1 (5)
Ukupno	258 (100,00)	20 (100,00)

Nije nađena statistički značajna razlika prema dobi za žene između ispitanica i kontrolne skupine ($\chi^2 = 5,919$, $df = 5$, $p = 0,2080$). Također, nije uočena statistički značajna razlika prema dobi između muških ispitanika obiju skupina ($\chi^2 = 2,8702$, $df = 5$, $p = 0,7200$).

Na tablici 12 prikazani su podaci koji pokazuju da nema značajne razlike između prosječnih godina žena i muškaraca za bilo koji broj spontanih pobačaja. Naime, razlika je prosječno uvijek ista i iznosi 2,5 godine. Najveći broj žena, njih 64%, u dobi je između 24 i 33 godine.

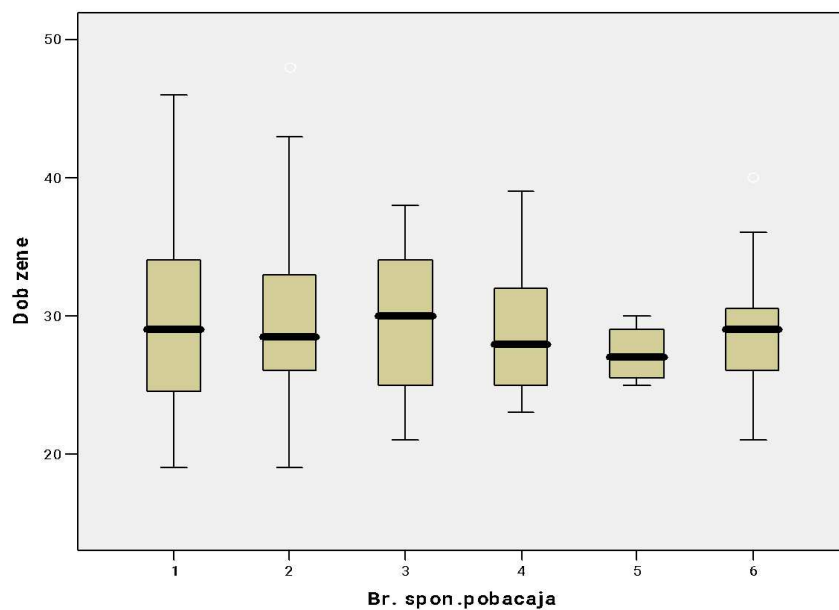
Tablica 12. Prosječna dob ispitanika u odnosu na broj spontanih pobačaja

Dob žene	Broj spontanih pobačaja						Ukupno
	1	2	3	4	5*	6**	
19-23	5	17	5	2		3	32
24-28	8	60	11	5	3	6	93
29-33	6	40	14	3	1	7	71
34-38	4	29	11	2		2	48
39-43	2	7		1		1	11
44-48	2	1					3
Ukupan broj žena	27	154	41	13	4	19	258
Prosječna starost žene	30,1	29,4	29,7	29,2	27,3	28,8	29,4
Prosječna starost muškarca	32,7	32,1	33,4	31,5	31,5	31,3	32,3

*spontani pobačaj medicinski indiciran

**spontani pobačaj, mrtvorodeni, i/ili *mors fetus in utero*, i/ili malformirani plod, i/ili IUZR

Na slici 11 prikazan je odnos dobi žena i učestalosti pobačaja; vidljivo je da životna dob žena ne utječe na učestalost pobačaja.



Slika 11. Povezanost životne dobi žena i broja spontanih pobačaja

Kliničke uputne dijagnoze, temeljene na ginekološkom i/ili ultrazvučnom pregledu, postojale su za 360 od spomenutih 574 slučaja. Za preostalih 214 slučaja podaci o dijagnozi nisu bili dostupni (tablica 13). Najveći broj bračnih parova došao je na ispitivanje s uputnom dijagnozom uz spontani pobačaj supruge (179). Posebno su izdvojene dvije kliničke dijagnoze, *mola hydatidosa* i *blighted ovum* (1,1% , odnosno 21,7% slučajeva).

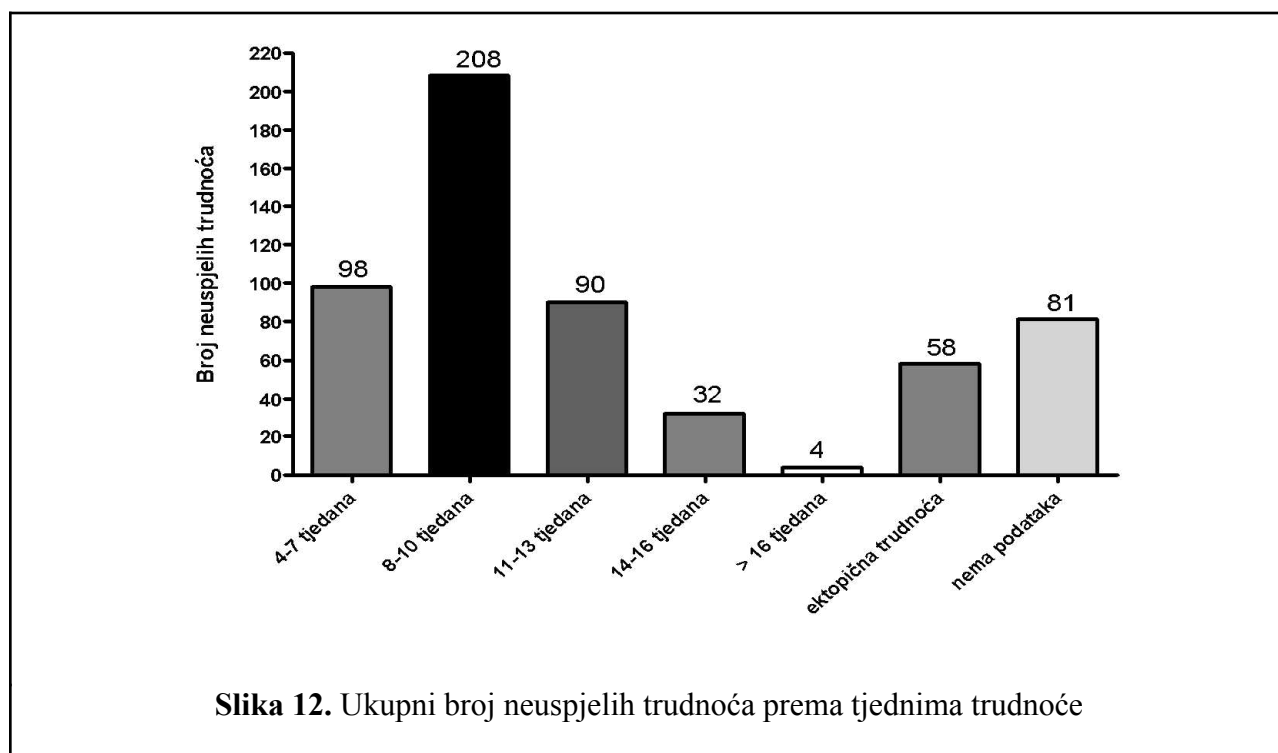
Tablica 13. Uputna dijagnoza kod dolaska u Genetsko savjetovalište

Uputna dijagnoza	Broj pobačaja N (%)*
spontani pobačaj – nedefiniran <i>abortus habitualis</i> <i>abortus completus</i> <i>abortus incompletus</i> <i>abortus imminens</i> <i>abortus retentus</i> <i>hydrovum</i> sterilitet infertilitet abortus – medicinski indiciran	179 (49,7)
<i>mola hydatidosa</i>	4 (1,1)
<i>blighted ovum</i>	78 (21,7)
spontani pobačaj i mrtvorodenče spontani pobačaj i <i>mors fetus in utero</i> spontani pobačaj i malformirani plod spontani pobačaj i IUZR spontani pobačaj i polip spontani pobačaj i konizacija spontani pobačaj i ektopična trudnoća	34 (9,4)
nema podataka o uputnoj dijagnozi (PHD poznata)	65 (18,1)
anamnestički podatak o postojanju spontanog pobačaja	214
Ukupno (360 s poznatim PHD i/ili postojećom uputnom dijagnozom i 214 samo s anamnestičkim podacima)	574

* postotak izračunat prema broju spontanih pobačaja s poznatom uputnom dijagnozom (N = 360)

U postupak genetskog ispitivanja uključeni su bračni parovi u kojih se barem jedan spontani pobačaj dogodio do/ili u 16. tjednu trudnoće. Slika 12 prikazuje broj spontanih pobačaja

po tjednima trudnoće. Važno je napomenuti da je svaki od ovih bračnih parova imao najmanje jedan spontani pobačaj do 16. tjedna trudnoće, a njihovi možebitni ostali pobačaji dogodili su se nakon 16. tjedna. Ukupno je u ovih 258 bračnih parova bilo je 574 pobačaja. Do 16. tjedna trudnoće zabilježeno je ukupno 435 pobačaja.



Najveći broj pobačaja dogodio se između 8. i 10. tjedna trudnoće (uzeti u u postupak prvi, drugi, treći i četvrti pobačaj). ANOVA analiza varijance i pripadajući F-test pokazali su da ne postoji statistički značajna razlika u prosječnim tjednima trudnoće u kojima se dogodio pobačaj između prvog, drugog, trećeg i četvrtog pobačaja.

Tijekom informacijskog razgovora s ispitanicima i kontrolnom skupinom skupljeni su podaci o brojnim parametrima, kakvi su primjerice podaci o prethodnim bolestima pojedinog člana bračnog para, obiteljska anamneza itd. (tablice 14 – 17). U tablici 14 prikazane su bolesti žena i muškaraca prije spontanog pobačaja. Od 258 žena 81 je bila zdrava, a za 16 nismo imali

podataka o prijašnjim bolestima. U 161 žene pronađeno je 6 različitih skupina bolesti, pri čemu su neke od tih žena imali više od jedne bolesti iz neke skupine. Tablica 14 pokazuje da postoji statistički značajna razlika u prethodnim bolestima za žene između ispitanica i kontrolne skupine ($\chi^2 = 6,8739$, $df = 4$, $p = 0,0322$). U istoj tablici nema statistički značajne razlike u prethodnim bolestima za muškarce između ispitanika i kontrolne skupine ($\chi^2 = 5,9354$, $df = 4$, $p = 0,0514$). Međutim, primjenom metode Monte Carlo razlika je statistički značajna i za muškarce ($p = 0,0490$).

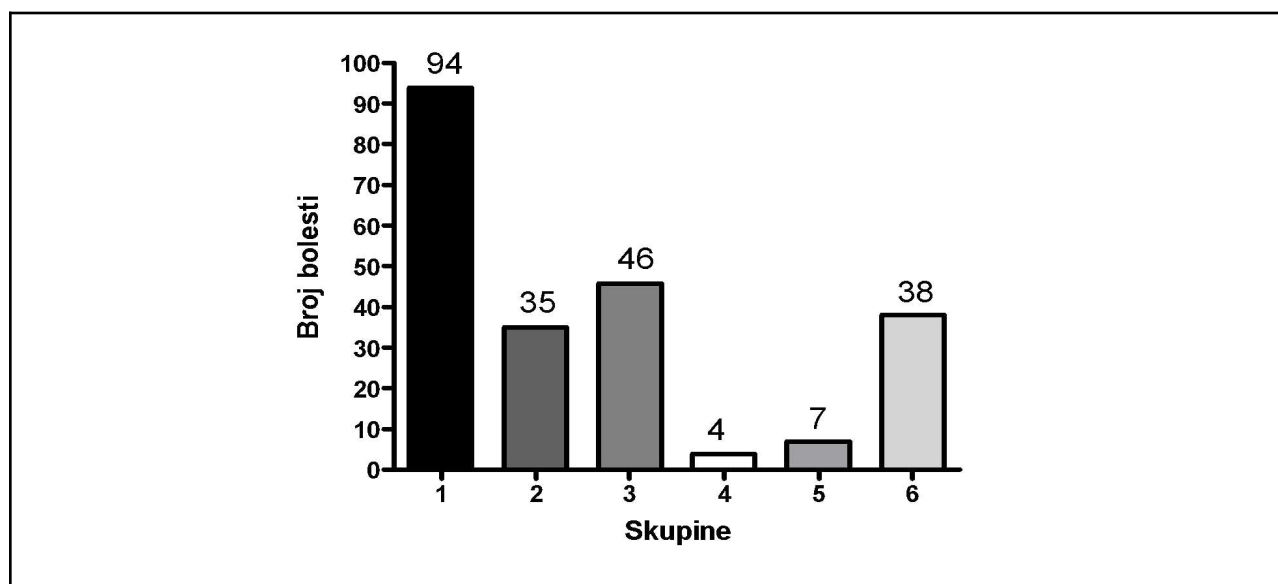
Tablica 14. Prethodne bolesti pojedinog člana bračnog para za sve ispitanike

Žene	Ispitanice N (%)	Kontrolna skupina N (%)
Zdrava	81 (31,39)	8 (40)
nema podataka	16 (6,21)	4 (20)
infekcije i anomalije urogenitalnog sustava (ingvinalna hernia, varicocoella), specifične infekcije spolnog sustava polip, konizacija, prethodni spontani pobačaj, neplodni brak, infekcija dišnog sustava, tuberkuloza, alergija, astma, autoimune bolesti, anemija, bolesti drugih organa	161 (62,4)	8 (40)
Ukupno	258 (100)	20 (100)
Muškarci	Ispitanici N (%)	Kontrolna skupina N (%)
Zdrav	104 (40,32)	13 (65)
nema podataka	31 (12,01)	3 (15)
infekcije i anomalije urogenitalnog sustava (ingvinalna hernia, varicocoella), specifične infekcije spolnog sustava, prethodni spontani pobačaj, neplodni brak, infekcija dišnog sustava, tuberkuloza, alergija, astma, autoimune bolesti, anemija, bolesti drugih organa	123 (47,67)	4 (20)
Ukupno	258 (100)	20 (100)

$\chi^2 = 6,8739$, $df = 4$, $p = 0,0322$ – za žene

$\chi^2 = 5,9354$, $df = 4$, $p = 0,0514$ – za muškarce

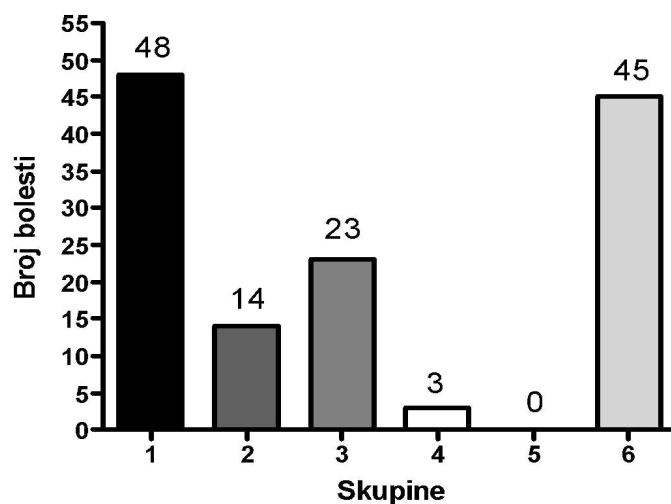
Od 258 muškaraca 104 su bila zdrava, a za 31 nismo imali podataka o prijašnjim bolestima. U 123 muškaraca pronađeno je 6 različitih skupina bolesti, pri čemu su neki od tih muškaraca imali više od jedne bolesti iz neke skupine. Pojedine bolesti i njihova učestalost prikazana je na slikama 13 i 14.



Slika 13. Skupine bolesti i broj njihova pojavnost u 161 žene

1. infekcije i anomalije mokraćnog i spolnog sustava (*Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus agalactiae*, polip, specifične vrste infekcija);
2. prethodni spontani pobačaj ili sterilni ili infertilni brak;
3. infekcije i bolesti dišnog sustava (tuberkuloza, alergije);
4. astma, autoimune bolesti;
5. anemije;
6. bolesti drugih organa (središnji živčani sustav, endokrinološke bolesti, kardiološke bolesti, bolesti probavnog sustava, bolesti lokomotornog sustava, druge kongenitalne anomalije, bolesti osjetilnih organa, metaboličke bolesti, tumori, ovisnosti, liječenje zračenjem).

Za 94 (58%) žene nađeni su podaci o prethodnim infekcijama mokraćnog i spolnog sustava, te anomalije istih. Urogenitalne infekcije prebolilo je 41% muškaraca (slika 14).



Slika 14 . Skupine bolesti i njihova pojavnost u 123 muškarca

1. infekcije i anomalije mokraćnog i spolnog sustava (*Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Escherichia coli*, druge specifične infekcije);
2. sterilni ili infertilni brak;
3. infekcije i bolesti dišnog sustava (tuberkuloza, alergije);
4. astma, autoimune bolesti;
5. anemije;
6. bolesti drugih organa (središnji živčani sustav, endokrinološke bolesti, kardiološke bolesti, bolesti probavnog sustava, bolesti lokomotornog sustava, druge kongenitalne anomalije, bolesti osjetljivih organa, metaboličke bolesti, tumori, ovisnosti, liječenje zračenjem).

U manjeg broja muških ispitanika napravljena je analiza spermograma i u 80% slučajeva spermogram je pokazao odtupanje od normale (tablica 15).

Tablica 15. Spermogram

Spermogram	Ispitanici N (%)
nema podataka	224 (86,82)
normalan spermogram	7 (2,71)
oligospermija, astenozoospermija, hipospermija	17 (6,59)
znakovi upale s ili bez oligospermije	10 (3,88)

Tablica 16. Obiteljska anamneza (žene)

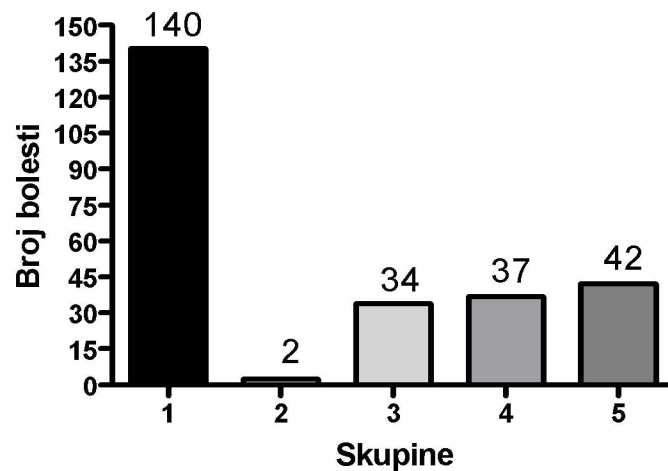
Žene	Ispitanice N (%)	Kontrolna skupina N(%)
uredna obiteljska anamneza	56 (21,71)	16 (80)
nema podataka	15 (5,81)	1 (5)

sterilitet i spontani pobačaji u obitelji, podaci o smrti djece u dojenačkoj dobi, mrtvorodena djeca, sindrom iznenadne smrti dojenčeta, mentalna retardacija, sindrom Down, drugi malformacijski sindromi, druge vrste anomalija, kosangvinitet, šećerna bolest tip 1 i 2, druge autoimune bolesti, astma, alergije, tumori, tuberkuloza, bolesti drugih organa, psihički problemi	187 (72,48)	3 (15)
Ukupno	258 (100)	20 (100)

$\chi^2 = 33,349$, $df = 2$, $p < 0,0001$

Obiteljska anamneza, prikupljena razgovorom sa 258 žena i crtanjem obiteljskog stabla, bila je uredna u 56 ispitanica. Od njih 15 nismo dobili podatke. U skupini od 187 žena našli smo 5 različitih skupina bolesti u njihovih srodnika, pri čemu su srodnici nekih žena imali više od jedne bolesti (tablica 16). Skupine bolesti i broj pojava tih bolesti u obiteljima žena prikazane su na slici 15. Najčešće su bile zastupljene bolesti opisane pod brojem 1. Našli smo ih u 140 ispitanica (od njih 187) što je 74,8%.

Među tim ispitanicama 38 (27,2%) je imalo podatke o spontanim pobačajima, mrtvorodenima ili sterilitetu u obitelji u I generaciji (sestra, brat), 94 (67,1%) u II generaciji (majka, otac, stric, tetka), a 8 (5,7%) u III generaciji (baka, djed, sestre i braća djeda i bake).



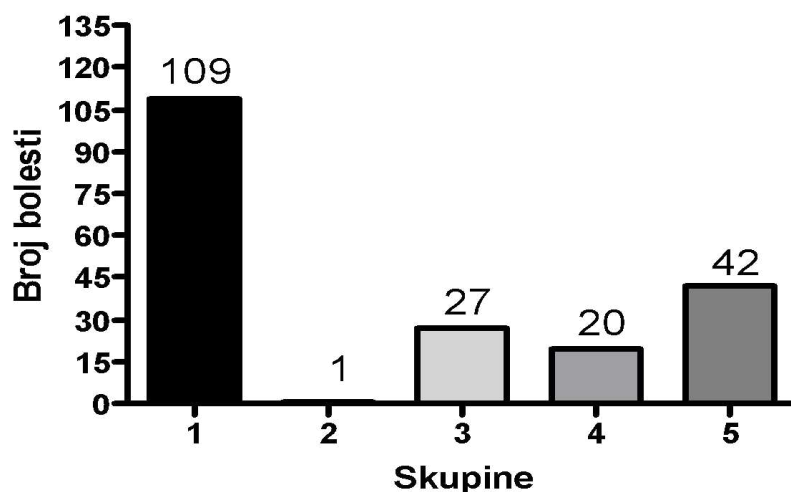
Slika 15. Obiteljska anamneza - žene

1. sterilitet i spontani pobačaji u obitelji, podaci o smrti djece u dojenačko doba, mrtvorodenoj djeci, sindromu iznenadne smrti dojenčeta, mentalnoj retardaciji, sindromu Down, drugim malformacijskim sindromima i drugim vrstama anomalija;
2. kosangvinitet;
3. šećerna bolest tip 1 ili 2, druge autoimune bolesti, astma, alergije;
4. tumori i tuberkuloza;
5. bolesti srca, mokraćnog sustava, bolesti središnjeg živčanog sustava, niski rast, bolesti osjetljivih organa i psihijatrijski problemi.

Tablica 17. Obiteljska anamneza - muškarci

Muškarci	Ispitanici N (%)	Kontrolna skupina N (%)
uredna obiteljska anamneza	74 (28,6)	12 (60)
nema podataka	31 (12,1)	2 (10)
sterilitet i spontani pobačaji u obitelji, podaci o smrti djece u dojenačkoj dobi, mrtvorodenoj djeci, sindromu iznenadne smrti dojenčeta, mentalnoj retardaciji, sindromu Down, drugim malformacijskim sindromima i drugim vrstama anomalija, kosangvinitet, šećerna bolest tip 1 i 2, druge autoimune bolesti, astma, alergije, tumori, tuberkuloza, bolesti drugih organa, psihički problemi	153 (59,3)	6 (30)
Ukupno	258 (100)	20 (100)

Obiteljska anamneza, prikupljena razgovorom i crtanjem obiteljskog stabla, bila je uredna u 74 ispitanika, dok od njih 31 nismo dobili podatke (tablica 17). Od 153 muškaraca dobili smo podatke o njihovim obiteljskim anamnezama i našli 5 različitih skupina bolesti u njihovih srodnika, pri čemu su srodnici nekih od tih muškaraca imali više od jedne bolesti iz neke skupine. U obiteljima ispitanika značajno češće javile su se ispitivane skupine bolesti i broj pojava tih bolesti u obiteljima prikazane su na slici 16 ($\chi^2 = 8,7348$, $df = 2$, $p = 0,0127$).



Slika 16. Obiteljska anamneza muških ispitanika.

1. sterilitet i spontani pobačaji u obitelji, podaci o smrti djece u dojenačkoj dobi, mrtvorodenoj djeci, sindromu iznenadne smrti dojenčeta, mentalnoj retardaciji, sindromu Down, drugim malformacijskim sindromima i drugim vrstama anomalija;
2. kosangvinitet;
3. šećerna bolest tip 1 ili 2, druge autoimune bolesti, astma, alergije;
4. tumori i tuberkuloza;
5. bolesti srca, mokraćnog sustava, bolesti središnjeg živčanog sustava, niski rast, bolesti osjetljivih organa i psihijatrijski problemi

Među ispitanicima za 32 (29,4%) nađeni su podaci spontanim pobačajima, mrtvorodjenim ili sterilitetu u obitelji u I generaciji (sestra, brat), 64 (64,2%) u II generaciji (majka, otac, stric, tetka), a 7 (6,4%) u III generaciji (baka, djed, sestre i braća djeda i bake).

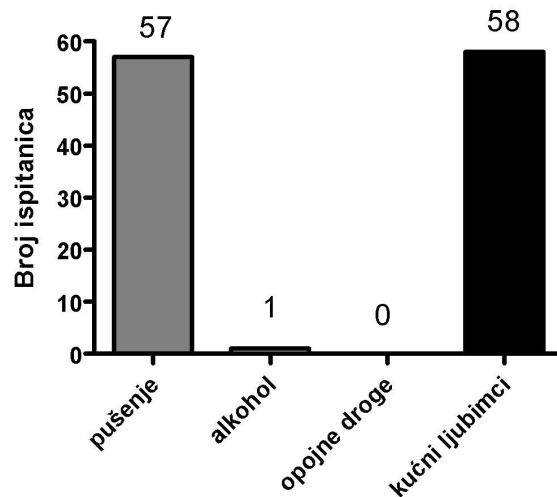
Tijekom razgovora postavljeno je i pitanje o štetnim navikama. Odgovore smo dobili od 122 ispitanice, od kojih su 92 imale jednu ili više navedenih navika, što je uočljivo u tablici 18.

Tablica 18. Štetne navike u ispitanica.

Žene	Ispitanice N(%)	Kontrolna skupina N(%)
bez niže navedenih navika	30 (11,62)	10 (50)
nema podataka	136 (52,72)	0 (0)
pušenje, alkohol, droga, životinje (mačka, pas, ptice, domaće životinje)	92 (35,66)*	10 (50)
Ukupno	258 (100)	20 (100)

* $\chi^2 = 30,577$, $df = 2$, $p < 0,0001$

Slika 17 prikazuje 4 navike, pri čemu su pušenje i držanje životinja bile zastupljene u najvećem broju. Ispitanice su značajno češće od kontrolne skupine imale štetne navike ($p < 0,0001$).



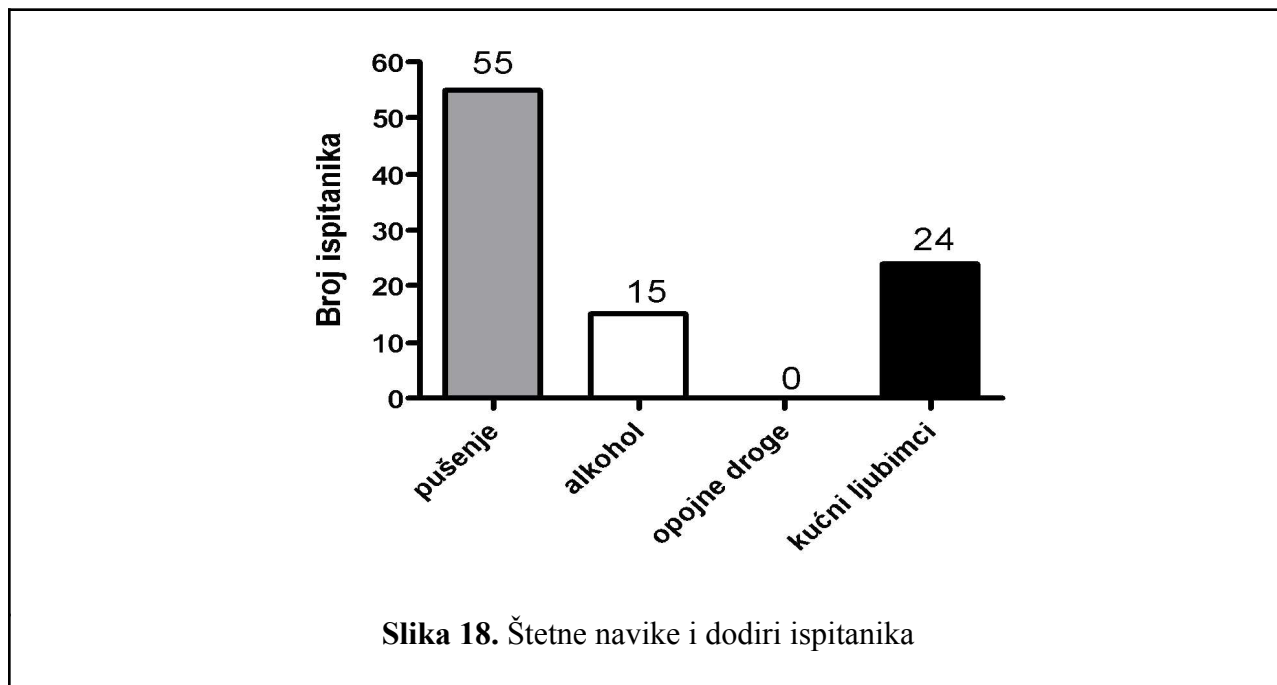
Slika 17. Štetne navike u ispitanica

Odgovore o navikama dobili smo od 88 ispitanika, od čega je 74 imalo jednu ili više navika (tablica 19). Na slici 19 prikazane su 4 navike, pri čemu je pušenje bilo najzastupljenije.

Tablica 19. Štetne navike u ispitanika

Muškarci	Ispitanici N (%)	Kontrolna skupina N (%)
bez niže navedenih navika	14 (5,43)	12 (60)
nema podataka	170 (65,89)	1 (5)
pušenje, alkohol, droga, životinje (mačka, pas, ptice, domaće životinje)	74 (28,68)*	7 (35)
Ukupno	258 (100)	20 (100)

* $\chi^2 = 70,55$, $df = 2$, $p < 0,0001$



Tablica 20. Onečišivač na radnom mjestu – žene

Zagađivači na radnom mjestu, žene	Ispitanici *N	Kontrolna skupina * N
Rad na računalu	82	8
Hrana	53	4
Kemikalije	36	1
Zračenje	3	0
Infekcija	5	5
Toplina	7	0
Hladnoća	4	0
Prašina	22	0
Nema podataka	52	0

*pojedina ispitanica bila je izložena većem broju u tablici navedenih onečišivača

Izloženost žena onečišivačima na radnom mjestu prikazana je u tablici 20. Najveći broj ispitanica radio je na računalu. Sljedeća kategorija su kuharice, konobarice i ugostiteljske radnice koje su bile u dodiru s hranom. Veći broj žena (frizerke i kozmetičarke) bio je izložen, na svom radnom mjestu, raznim kemikalijama. Učestalost izloženosti pojedinom onečišivaču bila je podjednaka. Za muškarce je redosljed izloženosti pojedinom onečišivaču (tablica 21) bio drugačiji. Najčešće su bili izloženi toplini i hladnoći, zatim zračenju računala, hrani i

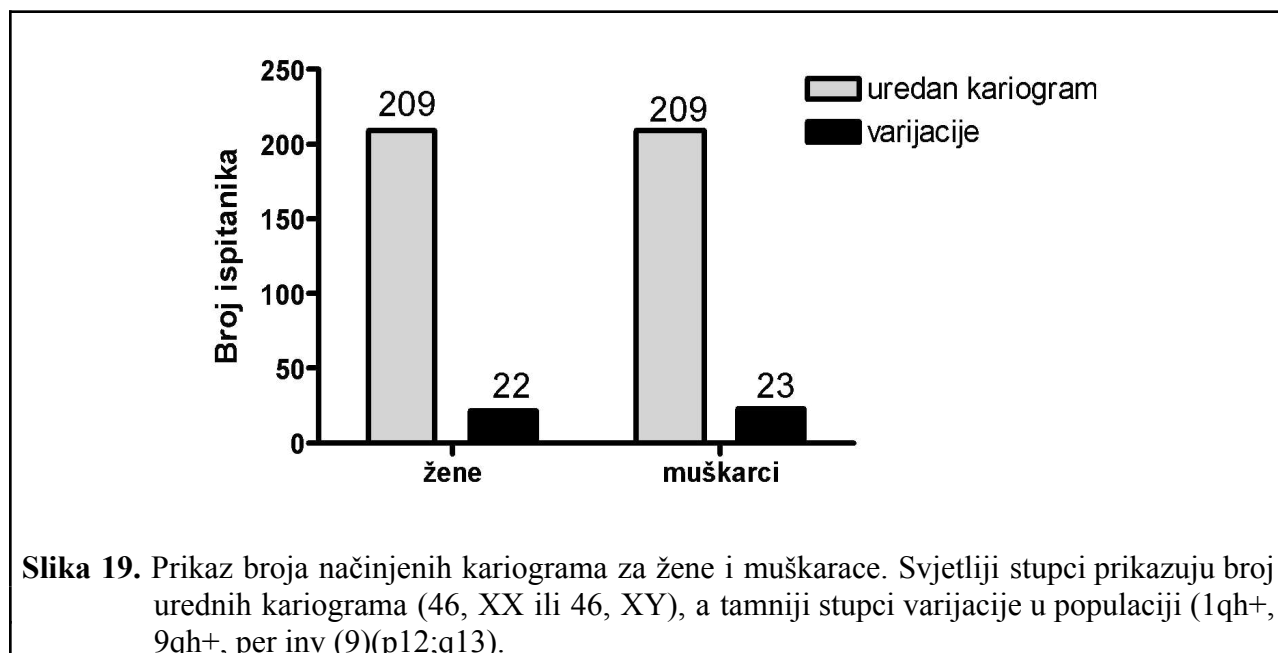
kemikalijama.

Tablica 21. Onečišćivači na radnom mjestu – muškarci

Onečišćivači na radnom mjestu, muškarci	Ispitanici*N	Kontrolna skupina*N
Rad na računalu	51	7
Hrana	32	6
Kemikalije	32	1
Zračenje	11	0
Infekcija	8	2
Toplina	54	0
Hladnoća	54	0
Prašina	46	4
Nema podataka	55	1
Nema zagađenja	11	0
Invalidi (vojni i civilni) i uposlenici MORH-a	8	0

*pojedini ispitanici bili su podvrgnuti većem broju navedenih onečišćivača

Broj analiziranih kariotipova muškaraca (232) i žena (231) prikazan je na slici 19. Varijacije u populaciji koje su nađene u limfocitima periferne krvi zastupljene su u 22 (9,5%) žena i 23 (9,9%) muškarca. U ispitanih žena je više zastupljen višak heterokromatina na 9. kromosomu (9qh+), a u muškaraca per inv 9 (p12;q13) (slika 19). Pericentrična inverzija i sekundarna konstrikcija (qh) kromosoma 9 smatra se normalnom varijacijom tog kromosoma. Slične varijacije se mogu naći i u pericentričnom dijelu kromosoma 1, 16 i Yq. Molekulskim metodama mogu se prema području (alfa, beta ili klasične satelitske DNA) u kojem se događa inverzija, razlikovati 4 tipa heteromorfizma (1, 66, 67).



Prisutnost specifičnih protutijela IgM za CMV nađena je samo u 6,84% ispitanica. Specifična protutijela IgG za CMV nađena su u 100 ispitanica od čega su u čak 13 (11%) bila izrazito povišena (više od 10 ili 100). Prisutnost specifičnih protutijela IgM VCA za EBV nađena je u 14 ispitanica (11%), dok je IgG protutijelo za EA bilo prisutno u 43 ispitanice. Specifična protutijela IgG VCA za EBV nađena su u 94 ispitanice, od čega su u čak 25 (20%) bila izrazito povišena (više od 100 ili 400) (tablica 22). Razlika između ispitanica i kontrolne skupine značajna je samo za protutijela IgG VCA za EBV.

Prisutnost specifičnih protutijela IgM za CMV nađena je samo u 3% ispitanika. Specifična IgG protutijela CMV nađena su u 78 ispitanika od čega su u čak 13 (13%) bila izrazito povišena (više od 10 ili 100).

Tablica 22. Prisutnost protutijela na specifične antigene citomegalovirusa (CMV) i virusa Epstein Barr (EBV) u ispitanica žena.

Prisutnost/odsutnost protutijela	Ispitanice N (%)	Kontrolna skupina N (%)
CMV IgM i IgG – ispitano u 117 žena		
IgM – odsutna	109 (93,16)	20 (100)
IgM – prisutna	8 (6,84)	0
	$\chi^2 = 1,452, df = 1, p = 0,2282$	
IgG – odsutna	17 (14,53)	4 (20)
IgG – prisutna	87 (74,36)	16 (80)
IgG – prisutna >10 ili >100	13 (11,11)	0
	$\chi^2 = 2,628, df = 1, p = 0,2688$	
EBV IgM VCA, EA IgG, IgG VCA, EBNA IgG - ispitano u 125 žena		
IgM VCA – odsutna	111 (88,8)	18 (90)
IgM VCA – prisutna	14 (11,2)	2 (10)
	$\chi^2 = 0,025, df = 1, p = 0,8736$	
IgG EA – prisutan	43 (34,4)	NA
IgG VCA – odsutna	31 (24,8)	0
IgG VCA – prisutna	69 (55,2)	20 (100)
IgG VCA – prisutna >100 i >400	25 (20,00)	0
	$\chi^2 = 14,598, df = 1, p = 0,0007$	
EBNA IgG – odsutna	65 (52,00)	NA
EBNA IgG – prisutna	53 (42,4)	NA
EBNA IgG – prisutna >400	7 (5,6)	NA

Prisutnost specifičnih protutijela IgM VCA za EBV nađena su u 6 ispitanika (6%), dok je IgG za EA bio prisutan u 5 ispitanika. Specifična protutijela IgG VCA za EBV nađena su u 78 ispitanika od čega su u čak 52 (48%) ispitanika bila izrazito povišena (više od 100 ili 400). Razlika između ispitanika i kontrolne skupine značajna je samo za IgG VCA/EBV (tablica 23).

Tablica 23. Prisutnost protutijela na specifične antigene citomegalovirusa (CMV) i virusa Epstein Barr (EBV) u muških ispitanika.

Prisutnost/odsutnost protutijela	Ispitanici N (%)	Kontrolna skupina N (%)
CMV IgM i IgG – ispitano 96 muškaraca		
IgM – odsutna	93 (96,88)	11 (100)
IgM – prisutna	3 (3,12)	0
	$\chi^2 = 0,354, df = 1, p = 0,5521$	
IgG – odsutna	18 (18,75)	3 (20)
IgG – prisutna	65 (67,71)	8 (80)
IgG – prisutna >10 ili >100	13 (13,54)	
	$\chi^2 = 1,891, df = 1, p = 0,3884$	
EBV IgM VCA, EA IgG, IgG VCA, EBNA IgG – ispitano 109 muškaraca		
IgM VCA – odsutna	103 (94,44)	10 (90)
IgM VCA – prisutna	6 (5,56)	1 (10)
	$\chi^2 = 0,234, df = 1, p = 0,6286$	
IgG EA – prisutan	5 (4,58)	-
IgG VCA – odsutna	31 (28,44)	0
IgG VCA – prisutna	26 (23,85)	20 (100)
IgG VCA – prisutna >100 i >400	52 (47,71)	0
	$\chi^2 = 42,708, df = 2, p < 0,0001$	
EBNA IgG – odsutna	50 (45,87)	-
EBNA IgG – prisutna	37 (33,95)	-
EBNA IgG – prisutna >400	22 (20,18)	-

Osim određivanja protutijela za specifične antigene CMV-a i EBV-a, u nekih je žena i muškaraca određena i prisutnost/odsutnost protutijela i za specifične antigene sljedećih mogućih teratogenih mikroorganizama: toksoplazma, Rubeola virus, HSV tip 1 i 2, HHV-6, Parvo B19,

Varicela/Zoster, parotitis, *listeria monocytogenes*, adenovirus, RSV, coksackie virus, virus influenza A, morbili (tablici 24).

Tablica 24. Prisutnost protutijela IgM specifičnih za pojedini mikroorganizam

A

Mikroorganizam	Žene *	Muškarci*
HHV-6	4/5	-
Rubeola	3/103	0/82
Toksoplazma	2/92	7/72
Parvo B19	7/56	0/49
HSV-1	8/88	4/80
HSV-2	0/69	34/70
VZV	7/21	3/21

*broj osoba sa prisutnim protutijelima IgM/ukupan broj testiranih osoba

B

Mikroorganizam	Žene +	Žene -	Muškarci +	Muškarci -	χ^2	Df	p
HHV-6	4	1					
Rubeola	3	100	0	82	0,95	1	0,3309
Toksoplazma	2	90	7	65	3,10	1	0,0783
Parvo B19	7	49	0	49	4,71	1	0,0300
HSV-1	8	80	4	76	0,53	1	0,4664
HSV-2	0	69	34	26	50,21	1	< 0,0001
VZV	7	14	3	18	5,88	1	0,0153

U samo manjeg broja ispitanika nađena su specifična protutijela IgM. Iz tablice 24B vidljivo je da je učestalost protutijela IgM za virus parvo B19 statistički značajno veća u žena nego u muškaraca ($p = 0,0300$). Suprotno je nađeno za virus HSV-2. Učestalost prisutnosti protutijela IgM bila je veća u muškaraca nego u žena ($p < 0,0001$). Za VZV je veća učestalost protutijela IgM bila u žena nego u muškaraca ($p = 0,0153$).

Protutijela IgG za HSV-1 nađena su u većeg broja ispitanika, i žena i muškaraca (tablica 25). Međutim, statistički je značajna samo smanjena učestalost prisutnosti protutijela IgG za

HSV-2 (tablica 25B).

Tablica 25. Prisutnost protutijela IgG specifičnih za HSV-1 i -2

A

Virus	Žene*	Muškarci*
HSV-1	78/88	64/80
HSV-2	35/69	1/70

*broj osoba sa prisutnim protutijelima IgG/ukupan broj testiranih osoba

B

Virus	Žene +	Žene -	Muškarci +	Muškarci -	χ^2	df	p
HSV-1	77	10	64	16	1,24	1	0,2663
HSV-2	35	34	1	69	41,47	1	< 0,00001

U skupini od 258 ispitanica zabilježeno je ukupno 574 pobačaja. Podatke o patohistološkom nalazu posteljice našli smo za 414 uzoraka. Od tih 414 opisa, uredan nalaz se našao u 61 slučaju. U preostalih 353 patohistoloških opisa nađene su promjene u različitim kombinacijama, tako da je u nekim posteljicama nađeno istovremeno više promjena (tablica 26).

Tablica 26. Patohistološki opisi posteljica pobačenih plodova

Patohistološki opis za I., II., III. i IV. pobačaj	Ispitanice	Kontrolna skupnina
degenerativno tkivo (D+F+V+TROF)	196	36
upalni elementi (U)	93	20
hidropske promjene i edem (H)	81	0
infarkt (I)	64	7
nekroza (N+Ca)	63	14
krvarenje (K)	41	0
pojava drugih specifičnih stanica (AS, HB itd.)	29	0
promjena strome i tromboza STR/TR	16	1
nezrele hematopoetske stanice (NH)	10	2
<i>molla hydatidosa</i> (M)	7	0

razlika između ispitanica i kontrolne skupine je statistički značajna (test za tablice kontingencije, $p < 0,0001$)

Najčešći opisi u posteljicama pobačenih plodova bili su: degenerativno tkivo, upalni elementi (leukociti, granulociti, limfociti) i hidropske promjene.

U tablicama 27 i 28 opisana je učestalost pojedinog patohistološkog nalaza s obzirom na prvi, odnosno drugi pobačaj. Najčešći patohistološki nalaz posteljice tijekom prvog pobačaja je «D» (degenerativno tkivo). Na drugom su mjestu upalne promjene («U»). Zajedno čine polovinu nadenih patohistoloških nalaza. Na trećem je mjestu, po učestalosti nalaz «H» (hidropske promjene).

Tablica 27. Prikaz učestalosti patohistoloških opisa kod prvog pobačaja

PHD opis	Broj žena (N)	(%)
D	13	38,3%
U	6	17,6%
H	4	11,9%
N	3	8,8%
UREDAN	3	8,8%
K	2	5,9%
I	1	2,9%
NH	1	0,0%
M	1	2,9%
STR/TR	0	0,0%
AS, HB	0	0,0%

Uspoređujući prvi spontani pobačaj s drugim glede patohistološkog nalaza možemo zaključiti da je patohistološki nalaz značajno različit isključivo za nalaz H (hidropske promjene) kod drugog spontanog u odnosu na prvi spontani pobačaj. Budući su svi rezultati iz istog uzorka, statistički možemo testirati slijedeću pretpostavku: da li se može kao istinita prihvatiti pretpostavka da je udio nalaza «H» u drugom spontanom pobačaju značajno veći od udjela istog nalaza u prvom spontanom pobačaju.

Tablica 28 . Prikaz učestalosti patohistoloških opisa kod prvog i drugog pobačaja

PHD opis	Broj žena/prvi pobačaj	Broj žena/ drugi pobačaj (N=154)	Postotak s obzirom na broj drugih pobačaja
D	1	63	30,2%
U	1	31	15,3%
H	0	36	17,6%
K	0	9	4,4%
I	0	2	1,1%
N	0	18	8,9%
STR/TR	0	5	2,6%
UREDAN	0	20	9,9%
NH	0	4	2,1%
M	0	0	0,0%
AS, HB	0	16	7,9%

Za to testiranje služili smo se Z-testom.

Pretpostavljene hipoteze su:

$$H_0 \dots p_2 \leq p_1$$

$$H_1 \dots p_2 > p_1$$

"Među" - izračun	
Grupa 1 - proporcija	0,148
Grupa 2 - proporcija	0,234
Razlika u dvije proporcije	0,086
Srednja proporcija	0,221
Z-test	1,309
p vrijednost	0,095
Nulta-hipoteza odbačena je na razini značajnosti od 10%	

Testiranje je provedeno uobičajnim jednosmjernim Z-testom. Kod postupka testiranja izračunata je empirijska razina značajnosti korištenjem slijedećih među-izračuna.

Budući empirijska razina značajnosti iznosi 9,5%, može se prihvatiti alternativna hipoteza (odnosno odbaciti nulta hipoteza) kako je udio nalaza «H» statistički značajno veći u drugom spontanom pobačaju u odnosu na prvi pri teorijskoj razini značajnosti od 10%. To znači da je učestalost hidropskih promjena u drugog pobačaja češća nego u prvog, dok u prvom pobačaju češća pojava upalne promjene „U“.

U nastavku je prikazana višedimenzionalna tablica (tablica 29) s obzirom na najznačajnije patološke nalaze prvog i drugog pobačaja istovremeno.

Iz tablice se može napraviti ukupno 49 testiranja o hipotezi da li se razlikuje broj žena prema odabranim patohistološkim nalazima između prvog i drugog spontanog pobačaja (hi kvadrat test) pretpostavljajući da su uzorci zavisni (McNemarov test).

Tablica 29. Višedimenzionalna tablica s najznačajnijim PHD nalazima prvog i drugog pobačaja istovremeno

Kratica	Drugi pobačaj	U		D		H		N		F		Uredan		Razno	
		0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Prvi pobačaj	Dostupnost podataka	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
U	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	24	8	24	8	25	7	29	3	29	3	28	4	30	2
D	0	162	32	151	43	156	38	176	18	184	10	174	20	181	13
	1	25	8	26	7	28	5	30	3	28	5	29	4	29	4
H	0	173	34	161	46	170	37	180	20	194	13	183	24	192	14
	1	13	5	14	4	12	6	17	1	16	2	18	-	15	3
N	0	172	35	160	47	170	35	190	17	195	12	183	24	190	16
	1	14	5	16	3	12	7	15	4	16	3	19	-	19	-
F	0	175	38	166	47	174	39	193	20	199	14	189	24	196	17
	1	12	2	11	3	10	4	13	1	13	1	14	-	13	-
Uredan	0	174	40	168	46	173	41	193	21	199	15	193	21	198	15
	1	13	-	9	4	11	2	13	-	13	-	10	3	11	2
Razno	0	182	38	172	48	179	41	199	21	206	14	196	24	203	16
	1	5	2	5	2	5	2	7	-	6	1	7	-	6	1

U – upala; D - degenerativno promijenjeno tkivo; H - hidropski promijenjeno tkivo, edem, eritroblasti, nezrela hematopoeza, mola; N - nekroza, kalcij, distrofični kalcifikati, ulaganja kalcija, ovapnjenja; F: fibrin, fibroza, fibrinske naslage, trofoblast, sinciciotrofoblast; Uredan - uredan nalaz; Razno - razne stanice (Arias Stella fenomen, Hoffman Bauerr-ove stanice, polip, CIN, korioepiteliom)

McNemar Change testom prikazana je značajnost razlika raznih parametara između prvog i drugog spontanog pobačaja. Značajna razlika postoji samo za H (*McNemar Change* test, Yates Chi2: 11.755 (p = 0.000) dok za U, D, N, F, Uredan i Razno nema statistički značajne razlike.

Komentirajući rezultate navedene u tablici 26 u svezi s patohistološkim opisom s patologom placentologom, zaključili smo da opis degenerativne promjene (D) može značiti blaži oblik hidropskih promjena, manju fibrozu resica, slabiju vaskularizaciju i pojedinačne nekrotične resice najčešće uklopljene u obilniji perivilozni fibrin. Time «D» znači manji oblik «H», ali isto i «F», i «V», i «N», i «Trof», što je sve značajnije različito od upalnih elemenata u opisu.

Protočna je citometrija napravljena na ukupno 299 uzoraka posteljica. Za 29 uzoraka nije bilo moguće interpretirati rezultate. U 209 uzoraka dokazan je diploidni sadržaj DNA. U 61 uzorku nađen je aneuploidni sadržaj DNA. Podaci su prikazani u tablici 30.

Tablica 30. Sadržaj DNA u tkivu posteljice

Sadržaj DNA	Broj uzoraka N (%)
Diploidni	209 (77,41)
Aneuploidni	61 (22,59)

Tablica 31. Lančana reakcija polimerazom za HPV u tkivima posteljice

HPV PCR	Ispitanice	Kontrolna skupina
Pozitivno	0	0
Negativno	50	20

Tablica 32. *In situ* hibridizacija za HPV u tkivima posteljice

HPV <i>in situ</i> hibridizacija	Ispitanice	Kontrolna skupina
Pozitivno	0	nije rađeno
Negativno	20	nije rađeno

Metodom lančane reakcije polimerazom i metodom hibridizacije *in situ* početnicama specifičnim za HPV u uzorcima DNA izoliranim iz tkiva posteljice nismo dokazali prisutnost HPV (tablice 31 i 32).

6. RASPRAVA

Humana reprodukcija često je neučinkovit proces. Prema izvješćima iz literature otprilike 65-90% rano izgubljenih trudnoća uzrokovane su promjenama kromosoma u stanicama ploda, a učestalost takvih promjena izravno je povezana sa životnom dobi majke (68). I u velikom broju ponovnih pobačaja plodovi imaju promjene kromosoma. Nadalje, 70-85% abnormalnih oocita i preimplantacijski izgubljenih embrija povezanih s *in vitro fertilizacijom* (IVF) imaju promjene kromosoma, a uspjeh IVF-e je obrnuto proporcionalan s dobi majke. Štoviše, kariotipovi preimplantacijski izgubljenih embrija, dobivenih IVF-om, žena koje su imale ponavljane pobačaje, pokazuju šest puta češću pojavu monosomija (68). Upotrebom tehnike prijenosa jezgre oocite starijih žena u enukleiranu oocitu mladih žena dokazano je da je uzrok aneuploidije, (a koja je povezane s dobi majke) citoplazma oocite a ne njena DNA. Ovaj nalaz upućuje na zaključak da je oocita, koja se u mejozi nalazi mnogo godina, izrazito podložna promjenama proteina citoskeleta (69).

U našem istraživanju u 258 žena i muškaraca nije dokazana povezanost s dobi majke i oca tj. najveći broj žena, njih 64%, životne je dobi između 24 i 33 godine.

U opsežnoj studiji provedenoj u Kanadi 1999. godine, na 22 199 bračnih parova (odnosno 44 398 osoba) u kojih su zabilježeni ponavljani gubici trudnoća, konstitutivne anomalije kromosoma u limfocitima periferne krvi opažene su u samo u 4,7 % slučajeva (68). U našoj studiji uzeti su u obzir samo oni bračni parovi koji su imali uredan konstitucijski kariotip.

U spermijima zdravih muškaraca učestalost anomalija autosoma (za svaki posebno) iznosi 0,03%, a učestalost anomalija spolnih kromosoma 0,11%. U samo se nekim istraživanjima ove anomalije povezuju se s dobi oca (70).

Nastanak aneuploidije tijekom oogeneze uglavnom je posljedica nerazdvajanja

kromosoma/kromatida i/ili preranog odvajanja kromatida tijekom I ili II mejotske diobe. Preranom odvajanju kromatida prethodi preddioba ili preuranjeno razdvajanje centromera, što pospješuje nerazdvajanje. Metodama kariotipizacije i komparativne genomske hibridizacije (CGH) dokazana je učestalija hipohaploidija, koja je kasnije potvrđena ispitivanjima na preimplantacijskim embrijima. Ovo ukazuje na važnost zastoja procesa mejoze na prijelazu II metafaze u II anafazu (tzv. anafazna pauza!) i na pravilno odvajanje kromatida. Mali kromosomi (akrocentrični) češće podliježu aneuploidiji iako i neki veliki kromosomi mogu podleći ovoj pojavi. Učestalost pojave nenormalnog broja kromosoma, određeni kariotipizacijom, u oocitama žena između 30 i 35 godina, iznosi oko 11%. Upotrebom preciznije metode (analize korionskih resica) postotak nađenih nenormalnosti broja kromosoma je još veći. Ovakva su istraživanja pokazala sklonost germinalnom ili gonadalnom mozaicizmu. Konstitucijska aneuploidija embrija najčešća je za kromosome 15, 16, 21 i 22, a slična učestalost nađena je i za kromosome 6, 14, X i Y. Trodnevni embriji žena mlađih od 37 godina imaju češće mozaičnu aneuploidiju (50%). Dva su glavna tipa mozaicizma: diploidni/aneuploidni i kaotični mozaik. Kaotični mozaicizam nastaje neovisno o dobi majke i može biti povezan s anomalijama centrosoma i često je muškog podrijetla. Najčešći aneuploidni mozaicizam je gubitak kromosoma. Potom slijedi aneuploidija zbog viška kromosoma, a najrjeđi je uzrok aneuploidnog mozaicizma nerazdvajanje u mitozu. Svi oblici aneuploidije mogu biti povezani s majčinom dobi, ali isto tako i s gubitkom nekih specifičnih produkata gena u stanicama embrija. Djelomična aneuploidija koja je rezultat lomova kromosoma nađe se u oko 10% embrija (71).

Zanimljiv je nalaz Maccarrone-a i suradnika koji je opisan u članku autora Lockwood-a (69) kojim je utvrđeno da anandamid i drugi endokanabinoidi, djeluju nepovoljno na implantaciju i razvoj embrija miša. Stvarni razlog tome je smanjenje razine i aktivnosti u limfocitima aktivnog enzima koji razgrađuje anandamid. Enzim se naziva FAAH (od engl. *fatty acid amide hydrolase*).

Autori smatraju da bi se određivanje razine FAAH moglo koristiti kao rani biljeg predispozicije nastanka spontanog pobačaja. Mogući mehanizam djelovanja endokanabinoida je modulacija regulacije o limfocitima ovisne mreže citokina, povezanih za uspješan ishodom trudnoće (69).

Rezultati prikazani u ovom radu pokazuju da se najveći broj pobačaja, i to 208, dogodio između 8. i 10. tjedna trudnoće (uzimajući u obzir prvi, drugi, treći i četvrti pobačaj). U razdoblju od 4. do 7. tjedna trudnoće bilo je 98 pobačaja, a od 11. do 13. tjedna 90, dok je do 16. tjedna bilo samo 32 pobačaja.

U našem ispitivanju unutar 463 ispitanika u manjem uzorku sačinjenom od 22 žene i 23 muškarca, što predstavlja oko 10 % (9,7%) ispitivanog uzorka, nađene su varijacije poput promjena u pericentričnom dijelu kromosoma 9 (per inv 9), višak heterokromatina na kromosomima 1 (1qh+) i 9 (9qh+) te pojačani sateliti na akrocentričnim kromosomima 13, 14, 15, 21 i 22. U općoj populaciji ove su promjene zastupljene učestalošću 10-15% (1, 66, 67).

Del Porto je analizom 257 bračnih parova našao 137 s dva ili više spontanih pobačaja, a u njihovim je kariotipovima stanica periferne krvi nađena isključivo per inv 9 (p12;q13) kao varijacija u populaciji (72).

Slično je, s obzirom na kromosom 9 i 16, nađeno i u istraživanju Buretić Tomljenović provedenom na 30 bračnih parova Primorsko-goranske županije i Istre koji su imali jedan ili više spontanih pobačaja i mrtvorodenu djecu sa ili bez malformacija (73). Ovo izvješće opisuje nešto učestalije promjene kromosoma 16 i manju učestalost promjena kromosoma 9 u odnosu na ranije objavljene reference (37). Držimo da se različita učestalost varijacija kromosoma 9 i 16 u populaciji može objasniti subregionalnom varijabilnošću (razlika između podataka iz Rijeke i Splita).

Heteromorfizam konstitutivnog heterokromatina je stabilna evolucijska promjena za koju se smatra da nema utjecaja na fenotip. Heterokromatinske regije kromosoma 1, 9, 16 i Y imaju

ulogu u imunom odgovoru tijekom ranog razvoja embrija. U žena i muškaraca koji su imali mrtvorodne ili malformirane plodove nađen je višak heterokromatina kromosoma 16 u odnosu na kontrolnu skupinu. Isti parovi su pokazivali značajno povišene srednje vrijednosti heterokromatina u potencijalnim zigotama. U bračnih parova koji su imali spontane pobačaje nađen je smanjen sadržaj ukupnog heterokromatina u potencijalnoj zigoti (74). Višak heterokromatina povezuje se s promjenom normalnog stanja metiliranosti ovih regija. Smatra se da je demetilacija (hipometilacija) uzrok povećanja heterokromatina (75). Baranov i suradnici pokazali su posebnosti metilacije metafaznih kromosoma preimplantiranih embrija čovjeka (76). Važnost uloge heterokromatina u procesu mejotskog razdvajanja kromosoma potvrdili su Demburg i suradnici (77). Ispitivan je također i utjecaj heterokromatina na ekspresiju gena koji se nalaze u njegovoj blizini. Smatra se da heterokromatin smanjuje aktivnost takvih gena (78, 79). Pokazana je također i razlika ponašanja konstitutivnog heterokromatina kromosoma 1, 16 i Yq u amniocitima i limfocitima periferne krvi. Heterokromatin u amniocitima snažnije prima specifične boje što ukazuje na njegovu jaču kondenziranost (80). Kondenzacija heterokromatina dobar je pokazatelj i uspješnosti IVF-e (81).

Na važnost pravilne kondenzacije heterokromatina u spolnim stanicama, u smislu izbjegavanja aneuploidije, ukazuju i drugi autori (82 - 85).

Važnost pravilne regulacije metilacije kromatina, čime se održava normalna homeostaza ekspresije gena, opažena je i u stanicama tumora, gdje se istovremeno događa globalna hipometilacija genoma i snažna hipermetilacija CpG regija unutar regulatornih regija gena. Ovo uzrokuje niz promjena kromosoma među kojima su nestabilnost kromosoma i aneuploidija (86). Uz pojavu metilacije i demetilacije (epigenetska kontrola ekspresije gena) veže se i pojam genskog upisa (*imprinting*) (87).

Imprinting je za sada otkriven uglavnom u genima koji su važni za prenatalni i postnatalni

rast te razvoj nekih tipova stanica. Deregulacija *imprintinga* uzrok je raznih bolesti ljudi, među njima i tumora. Veza između mehanizma epigenetskog nasljeđivanja i strukture i funkcije kromosoma su metilacija histona i protein heterokromatina (HP1). Da bi započeo proces *imprintinga* (metilacije), izgleda da je ključna modifikacija strukture kromatina (88, 89).

Iako klasična kariotipizacija ploda, posteljice i hidatiformne mole nije ispitivana u ovom radu ipak smatramo važnim opisati rezultate autorice Brajenović Milić (90). Istraživanja su provedena na uzorcima anembrijskih trudnoća, ranih fetalnih smrti i hidatiformnih mola osoba Primorsk – goranske županije i Istre metodama dugotrajne kulture i GTG pruganja. Aberantni kariotip nađen je u 37,8% od ukupno 119 uzoraka. Najčešće su bile trisomije, uključujući dvostruke trisomije (35,6%), potom ploidijske (33,3%), mozaicizam (11,1%), strukturne anomalije (4,4%) i monosomije kromosoma X (2,2%). Trisomija jednog kromosoma bila je predominantna promjena u anembrijskim trudnoćama (64,3%), dok je u slučajevima ranog gubitka trudnoće trisomija (uključujući i dvostruku) nađena u 38,9% i triploidija u 27,8% uzoraka. Učestalost triploidije u odnosu na ostale anomalije kromosoma nađena je u 28,9% uzoraka, a u parcijalnim hidatiformnim molama iznosila je 53,8 % (90).

Analizom 1743 bračna para (3486 ispitanika) s učestalim spontanim pobačajima, nađeno je 5,34% aberacija kromosoma u limfocitima periferne krvi od kojih su 2/3 autosomne balansirane translokacije, što je 30 puta češće nego što se opisuje u općoj populaciji (91).

U ovom je radu stanje ploidnosti određivano metodom protočne citometrije na 270 uzoraka posteljica. U 23% uzoraka nađena je aneuploidija uključujući i tetraploidiju.

Slično je nađeno i ispitivanjem 217 uzoraka posteljica iz prvog tromjesečja trudnoće. Aneuploidija je nađena u 26 uzoraka (12%). Od toga je 12 uzoraka (5,6%) bilo tetraploidno, a 7 netriploidno/tetraploidno. Od triploidnih posteljica 5 ih je bilo nehidropski promijenjeno (92).

De Vita i suradnici (1993) ispituju materijal spontanih pobačaja s dvijema metodama:

citogenetskom i metodom protočne citometrije, te u 38 uzoraka nalaze 10 aneuploidnih (93). Fukunaga i suradnici (1993) ispituju uzorke ranih spontanih pobačaja samo protočnom citometrijom i nalaze 12% aneuploidnih uzoraka od 217 posteljica uklopljenih u parafin (94). Koenig i suradnici (1993) nalaze 12 triploidija u uzorcima od 32 posteljice (95). Lorenzato (1995) ispituje 46 uzoraka uspoređujući patohistološki nalaz s nalazom protočne citometrije, ne nalazi odgovarajuće usporedbe, ali nalazi 45,7% triploidija (96). Rua i suradnici (1995) metodom protočne citometrije ispituju 540 uzoraka nakon intrauterine smrti ploda i nalaze 65,0% urednih posteljica, 38 triploidija i 12 tetraploidija. Naglašava se veći broj poliploidnih uzoraka u mlađih osoba (97). Van de Kaa i suradnici, te Jeffers i suradnici (1995) ispituju kompletne i parcijalne *hidatiformne mole* metodom interfazne citogenetike, DNA citometrije i slikovne analize protočnom citometrijom u blizanačke trudnoće, molarnih i nemolarnih pobačaja. Nalaze poliploidiju kao odraz perzistentne trofoblastične bolesti (98, 99). Van de Kaa i suradnici, potom Paradinas i suradnici, prikazuju usporednu analizu DNA protočne citometrije, interfazne citogenetike u diferencijalnoj dijagnozi i prognozi *hidatiformnih kompletnih/inkompletnih mola* i nemolarnih hidropskih pobačaja; nalaze 146 triploidnih i 107 diploidnih uzoraka. Učestalost pojave triploidnih uzoraka povećava se i do 4,8 puta kod žena starijih od 40 godina (100, 101). Ozeren i suradnici prikazuju studiju na 20 anembrijskih trudnoća, analizirali protočnom citometrijom i nalaze 40% više aneuploidija nego u spontanim pobačajima (102).

Postoje i druge metode ispitivanja spontanih pobačaja koje su možda i preciznije od protočne citometrije, ali je za takvu pretragu potrebno imati svjež uzorak tkiva i nije moguće retrospektivno ispitivanje. Eiben i suradnici objavili su rezultate ispitivanja 750 uzoraka, od čega je 68% bilo prije 12 tjedna gestacije. Direktnom metodom ispitivanja našli su 50,1% abnormalnih kariotipova (103). Minelli i suradnici (1993) ispitivali su 52 uzorka i našli 67% abnormalnih

kariotipova. Prevladavaju trisomije 16 i 22 u skupini *blighted ovum* (104). Eichenlaub Ritter (1996) citogenetski ispituje spermije i oocite prvoig reda tijekom IVF-a i nalazi hiperploidiju povezanu s roditeljskom dobi (105). Qumsiyeh (1998) u 141 uzorku tkiva posteljice i fetusa (od 6. do 24. tjedna trudnoće) nalazi 30% kromosomskih aberacija (5). Kaspar i suradnici uspoređuju citometriju i kariotipizaciju kod 51 uzorku spontanijh pobačaja i nalaze 21 triploidiju, 19 diploidija i 11 aneuploidija (106). Periimplantacijsku studiju embrija izvršili su Simon i suradnici 1998. godine te su našli povećan broj kromosomskih aberacija u žena s učestalim spontanijh pobačajima (58 % aneuploidija) (107). Carp i suradnici (2001) prikazuju 167 ispitanica s 3-16 pobačaja prije 20. tjedna trudnoće, i nalaze 29 kromosomskih aberacija, od čega 94% aneuploidija i 6 % strukturnih promjena (108). Kalousek i suradnici ispituju učestalost mozaičnih promjena u posteljici kod 48 uzoraka (31 nemozaičan i 11 mozaičnih patoloških kariotipova) (109). Roland i suradnici otkrivaju CVS-om posteljični mozaicizam u 26 trudnica koje nisu željele prekinuti trudnoću. U djece nema promjena u porođajnoj težini i izostao je IUZR (110). Dugotrajnom kulturom i direktnom metodom na 107 uzoraka Griffin i suradnici (1997) ispituju posteljični mozaicizam (111). Metoda interfazne genetike upotrebljava se u praksi za usporedbu s citogenetskom metodom (112, 113). Metode CGH i FISH su vjerojatno tehnike budućnosti (114, 115). Usporedbom s metodama klasične citogenetike odnos nađenijh abnormalnijh kariotipova je 42,8% prema 65,8% (3). Uspoređivanje FISH metode s molekulskim metodama ne pokazuje takve rezultate (116, 117). Molekulskim metodama (118) i metodama protočne citometrije (119, 120) uspoređuju se kompletne i inkompletne mole.

Uputne dijagnoze u našijh ispitanika rasporedili smo u nekoliko skupina. Veliku skupinu (49,7%) čine dijagnoze koje govore o kliničkom, ginekološkom obliku pobačaja (*habitualis, completus, incompletus, imminens*) ili se samo spominje spontani pobačaj kao sterilitet ili infertilitet. Uputna dijagnoza naziva *molla hydatidosa* nađena je u 1,1% slučajeva, a *blighted*

ovum (hydrovum) odnosno anembrijska trudnoća u 21,7% slučajeva. Uputna dijagnoza spontani pobačaj i mrtvorodenče, ili smrt fetusa *in utero*, ili uz malformirani plod ili IUZR, uz ektopičnu trudnoću, polip, konizaciju nađena je u 9,4 % slučajeva. Za 18,1% slučajeva nije bilo podataka o uputnoj dijagnozi.

Iz podataka obiteljske anamneze oba bračna partnera vidljivo je da u čak 140 (od 187) žena, i 109 (od 153) muškarca postoji obiteljsko opterećenje sterilitetom i spontanim pobačajima, smrću djece u dojenačkoj dobi, mrtvorodenom djecom, sindromu iznenadne smrti dojenčeta, mentalnoj retardaciji, sindromu Down, drugim malformacijskim sindromima i drugim vrstama anomalija. U obiteljskim su anamnezama često spominjane i razne bolesti drugih organa (22,5%), te šećerna bolest i druge autoimune bolesti (18,2%). Podatke o spontanim pobačajima, mrtvorodenima ili sterilitetu u obitelji u I generaciji (sestra, brat), II generaciji (majka, otac, stric, tetka) i III generaciji (baka, djed, sestre i braća djeda i bake) imalo je 38 (27,2%), 94 (67,1%) i 8 (5,7%) osoba.

U skupini muškaraca iste je podatke dalo 32 (29,4%) za I generaciju, 70 (64,2%) za II generaciju i 7 (6,4%) za III generaciju. Kada se unutar ovih skupina pročiste podaci izbacivanjem podataka o sterilnim brakovima, umrloj djeci, mrtvorodenim ili mentalno retardiranim rođacima, ostaju samo podaci o spontanim pobačajima u I, II i III generaciji. Oni su znatno brojniji nego u općoj populaciji: u žena 50,0% a u muškaraca 48,6%. Ukupni rizik pobačaja za muškarce i žene u općoj populaciji iznosi 33% (121, 122).

Dob majke, ali i oca (123) važni su za učestalost spontanih pobačaja, kao i broj ranijih spontanih pobačaja. U žena koje su imale aneuploidiju u prethodnoj trudnoći, povišen je rizik za sljedeću trudnoću s aneuploidnim zametkom (124). U našoj studiji žene su bile u dobi od 24 – 33 godine.

Danas se uz obiteljsku anamnezu sve češće provode istraživanja polimorfizama raznih gena, poglavito onih vezanih uz krvarenje i metaboličke bolesti u žena koje su imale učestale pobačaje, te su primjerice nađeni polimorfizmi gena za MTHFR (engl. *methylene-tetrahydrofolate reductase*) koji je karakterističan za razvoj grešaka neuralne cijevi (125) i čimbenike koagulacije, naročito faktora V (Leiden) (126). Nositelji (heterozigoti) mutacije (R506Q) gena faktora V imaju češće pojave spontanih pobačaja (126, 127). Veći broj spontanih pobačaja nađen je u majki koje su imale dijete s NTD (od engl. *neural tube defect*) u prethodnoj trudnoći (128).

Neki su autori istraživali i polimorfizme gena za ženske spolne hormone (129, 130). Nadalje, polimorfizam gena za metionin sintetazu povezan je s rizikom rođenja djeteta sa sindromom Down (131, 132, 133).

Sve je veći broj podataka o činjenici da se sklonost učestalim pobačajima može povezati i s obiteljskom anamnezom sekundarnog antifosfolipidnog sindroma (imunosna promjena) (134, 135).

Spontani pobačaji su češći u obiteljima u kojih se pojavljuje kosangvinitet (136). Tako su žene s nasljednom rekurentnom *hidatiformnom molom* homozigotne za autosomno recesivnu mutaciju gena koji se nalazi na kromosomu 19q13.3-13.4. U istom se području kromosoma nalazi skupina «cinkov prst» gena, od kojih je barem jedan, *Peg 3*, izgleda, povezan s razvitkom *hidatiformne mole*. Proteinski produkt ovog gena sudjeluje u signalizacijskoj mreži čimbenika nekroze tumora – NF κB (TNF, od engl. *tumor necrosis factor*), koji regulira proliferaciju, diferencijaciju i programiranu smrt stanica. *Peg3* je gen koji podliježe genskom upisu. Nastajanje upisa kod majke događa se tijekom rasta oocite i bilo koji događaj, koji zaustavi taj proces tijekom embriogeneze, dovodi do promijenjene ekspresije gena, bilo majčinih ili očevih (137, 138).

Posebna vrijednost naše studije je činjenica što su u obiteljskom stablu prisutni podaci o spontanim pobačajima I, II i III generacije bliskih rođaka. Rijetki su autori koji su, poput Parazzini-a i suradnika, sačinili sličnu analizu (139). Prikazali su slučajeve 94 žene s jednim ili više spontanih pobačaja. Upitom o obiteljskoj anamnezi većeg broja žena nađeno je obiteljsko opterećenje pobačajima nego u kontrolnoj skupini žena koje su imale normalnu trudnoću i porod. Godina pojave menarhe i broj poroda majki i kćeri bio je sukladan, sasvim različito od podataka o spontanim pobačajima (140, 141).

U našim je istraživanjima tijekom razgovora postavljeno i pitanje o štetnim navikama. Odgovore smo dobili od 122 ispitanice, od čega su 92 imale jednu ili više navedenih navika. Pušenje i držanje životinja bili su zastupljeni u najvećem broju.

U populaciji muškaraca odgovore smo dobili od 88 ispitanika. Sedamdeset i četiri ih je imalo jednu ili više navedenih štetnih navika, pri čemu je pušenje bilo najzastupljenije.

U obje skupine (žene i muškarci) učestalost je štetnih navika bila statistički značajno viša u skupini ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu. Pušenje cigareta smanjuje fertilitnost, povećava broj spontanih pobačaja i povećava učestalost abrupcije placente, nastajanje *placenta praevia*, krvarenja tijekom trudnoće i preranog prsnuća vodenjaka. Novorođenčad, koja su izložena pušenju tijekom trudnoće, rađaju se s težinom manjom od 2500 g., a posebno su sklona iznenadnoj smrti novorođenčeta. Relativni rizik pobačaja među pušačima je 1,1 – 1,3 (10 – 20 cigareta) (141). Bioritam majke, kao i njena izloženost stresu, bitni su vanjski čimbenici koji mogu utjecati na ishod trudnoće (142, 143).

Uživanje marihuane nije se moglo povezati s učestalijom pojavom spontanih pobačaja (144).

Rezultati ispitivanja o teratogenima vezanim uz onečišćivače na radnom mjestu različiti su za žene i muškarce. Najveći broj ispitanica u našoj studiji radio je na računalu. Iako je zasada

teško reći da li ovakva vrsta posla pogoduje nastanku pobačaja, podaci iz literature govore da zračenje, ionizirajuće i neionizirajuće, pogoduje nastanku pobačaja (145-147). Manjak folne kiseline udružen sa zračenjem povećava nestabilnost kromosoma i povezuje se s aneuploidijom kromosoma 21 (148, 149).

Slično djeluje i izloženost atmosferskom pritisku tijekom putovanja avionom. Ispitivanja na laboratorijskim životinjama pokazala su da ultrazvuk djeluje teratogeno u vidu neuroloških, razvojnih, hematoloških, genetskih i strukturnih anomalija. Nema, međutim, dokaza o teratogenom djelovanju dijagnostičkog ultrazvuka na trudnicu. Elektromagnetsko zračenje, toplina, herbicidi, pesticidi, organska otapala (ksilen, toluen) i teški metali (živa, olovo) povećavaju učestalost spontanih pobačaja (150, 151)

Slijedeća kategorija naših ispitanica su kuharice, konobarice i ugostiteljske radnice koje su svakodnevno u dodiru s hranom. U literaturi postoje različiti podaci o utjecaju hrane na razvitak pobačaja. Tako je pokazano da čokolada ne izaziva pobačaj u trudnih miševa. Suprotno tome, alkohol povisuje sklonost pobačajima. Tako je npr. u 29% Ruskinja, koje su rodile dijete s fetalnim alkoholnim sindromom, u anamnestičkim podacima nađeno, da su ranije imale pobačaje tijekom prvog ili drugog trimestra trudnoće, da se u 12-25% slučajeva događala perinatalna smrt, a u 22% prerani porod. Intravenska primjena alkohola trudnim miševima 6. i 7. dana trudnoće uzrokovala je smrt embrija, ali ne i promjene na preživjelim fetusima (152).

Kofein iz kave (uzimanje više od 3 šalice kave na dan) povećava rizik za spontani pobačaj. Kava je embriotoksična u dozi od 75-80 mg/kg. Kline i suradnici (28) su pokazali, kariotipizacijom 900 uzoraka pobačenih plodova, učestalije pobačaje s urednim kromosomima, kod onih žena koje su uzimale više od 162 mg/dan kofeina. Slično su pokazali i drugi autori (153-156).

Aditivi, saharin i aspartam, ne dovode do povećane pojave spontanih pobačaja u miševa.

Debljina je povezana s učestalijim pobačajima (157).

Veći broj žena (frizerke i kozmetičarke) bio je izložen na svom radnom mjestu raznim kemikalijama.

U ovoj studiji redoslijed učestalosti izloženosti pojedinom zagađivaču (rad na računalu, hrana, kemikalije, prašina, toplina, hladnoća itd.) bila je podjednaka kod žena. Kod žena je najzastupljenija štetna navika bila pušenje i kod ispitanica i kod kontrolne skupine. Za muškarce je redoslijed bio drugačiji, tj. najčešće su bili izloženi toplini i hladnoći, zatim zračenju računala, hrani i kemikalijama.

Učinak izloženosti roditelja teratogenima može se ispitivati nakon ekoloških nesreća ili ratova. Međutim, i u svakodnevnom su životu žene i muškarci izloženi raznim onečišćivačima kao što su kozmetički pripravci koji se upotrebljavaju u frizerskoj struci. U jednom ispitivanju, provedenom na 714 trudnoća, nije nađena statistički značajna učestalost spontanog pobačaja ili kongenitalnih anomalija. Rascjep usnice i nepca je bila najčešća anomalija (34, 151). U našoj studiji od 258 ispitanica 40 ih je tehničarki, kemijskih radnica i kamenoklesarica, 23 kuharica, konobarica i ugostiteljskih radnica, 57 medicinskih sestara, a 8 frizerki i kozmetičarki.

Uporaba neke kemikalije i njeno potencijalno štetno djelovanje na plod ovisi o trajanju izloženosti noksi i prozračnosti prostora u kojem se obavlja posao (lak za nokte i kosu, aceton, kemikalije za bojanje kose itd). Tako je jedna studiji pokazano povećanje rizika gubitka ploda i do 60% u kozmetičarki ili onih koje su bile izložene isparavanju laka za nokte (158-160).

Izloženost benzenu u razdoblju oko začeća pokazuje mali porast pojava broja malformacija iz reda velikih grešaka i malformacija kralježnice (161-167). Pressinger i Sinclair u preglednom članku navode veliki broj podataka o vanjskim uzrocima steriliteta i pobačaja (163). Infertilnost je opažena u 4,1% žena između 15-24 godina. U dobnoj skupini od 15 do 34 godine i 35 do 44 godine učestalost sterilnosti raste s godinama na 13,1% i 21,4%. Rizik za pobačaj u

žena od 20 do 29 godina iznosi 10%, a za starije od 45 godina 50%. Otprilike 8-12% muškaraca je sterilno, a pobačaj u njihovih partnerica je češći u onih koji imaju partnera s manjim brojem spermija. U žena sa spontanim pobačajima 48% muževa imalo je abnormalan spermogram. U 40% infertilnih parova problem je u muškarcu. Pušači imaju manji broj spermija i veći broj abnormalnih. Spontani pobačaji češći su u žena koje rade na mjestima gdje su izložene kemijskim otapalima (ksilen, aceton, tetrakloretilen, petrolej, onima koje rade u tekstilnoj industriji, kemijskim čistionama, koje rad s olovom, živom i kadmijem). Otprilike 20-25% pobačaja uzrokovani su problemima imunološkog sustava. Prirodne anomalije javljaju se češće kod anestezioloških sestara (16,4%), stomatologa i stomatoloških asistentica (24% prema 11%) (168).

Muški ispitanici u ovom radu (258) bili su zastupljeni sa 70 zaposlenika tehničke struke (automehaničari, električari, stolari, pomorci, vozači), 50 vojnika, policajaca, vojnih invalida ili zaposlenika MORH-a ili HV-a, 29 konobara, kuhara, pekara i ugostiteljskih radnika.

U ovom radu 58% ispitanica i 41 % ispitanika imalo je, prije pojave spontanih pobačaja, upalu mokraćnih ili spolnih organa. Postoji statistički značajna povezanost između pojave infekcije i anomalija mokraćnog i spolnog sustava (*Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Escherichia coli*, specifične vrste infekcija) i spontanih pobačaja.

Od 258 žena 80 je bilo zdravih, a za 16 nismo imali podataka o prethodnim bolestima. U 162 žene pronađeno je 6 različitih skupina bolesti, pri čemu su neke imale više od jedne bolesti iz neke skupine. Od ukupnog broja ispitanika samo je kod njih 34 načinjen spermogram koji je u 80% slučajeva pokazao odstupanja od normale.

Od 258 muškaraca 110 ih je bilo zdravih, a za 31 nismo imali podataka o prijašnjim bolestima. U 117 muškaraca pronađeno je 6 različitih skupina bolesti, pri čemu su neki imali više

od jedne bolesti iz neke skupine. Nađena je statistički značajna razlika u ranijim bolestima između ispitanica i kontrolne skupine. Međutim, metodom Monte Carlo razlika je statistički značajna i za muškarce ($p = 0,0490$).

Podaci o prethodnim infekcijama mokraćnog i spolnog sustava te anomalije istih, nađene su u 94 (58%) od 162 žene, te u 48 (41%) od 117 muškaraca.

Za vrijeme trudnoće može doći do infekcije majke od koje se potom inficira i plod. Najčešća infekcija trudnice je uroinfekcija, a ona može biti simptomatska i asimptomatska u 7-10% trudnica. Uzročnici su najčešće gram negativne bakterije (*E. coli*). Oko 20-30% djece zarazi se prolaskom kroz porodni kanal; pokazuju se kliničkom slikom novorođenačke septikemije i meningitisa s visokom stopom smrtnosti. Zatim slijede spolne infekcije koje se mogu širiti i hematogeno i ascendentno kao što su infekcije uzrokovane *listeriom monocytogenes* (10% neonatalne sepse), streptokokima grupe B i enterokokima (*S. faecalis*, *E. faecium*). *Chlamydia trachomatis* i mikoplazme su najčešći uzročnici pobačaja, mrtvorodne djece i raznih infekcija ploda a šire se ascendentno. Sindrom intraamnijske infekcije nastaje ascendentno iz grlića maternice, zahvaća donji pol ovoja, plodovu vodu i posteljicu. Fetus se može zaraziti kroz pupkovinu (*vasculitis umbilicalis*) ili gutanjem plodove vode. U trudnice se javljaju simptomi prijetećeg pobačaja, a ako se na vrijeme ne prepozna, može doći do akutnog septičkog oblika bolesti (34, 41).

Chlamydia trachomatis uzrokuje spolno prenosivu bolest i može se izolirati u 2-10% ženske i muške populacije. Dokazano je da muškaraci i žene koji imaju ponovljene spolne infekcije klamidijom, imaju tkivnu predispoziciju za neke vrste genotipova klamidije, kao što je npr. triptofan-sintetaza genotip. Smatra se da u prisutnosti IFN- γ (uklanjaju raspoloživi triptofan) postoji poseban odnos između domaćina i parazita što pridonosi razvitku trajne infekcije

klamidijom (169-172).

Mycoplasma hominis i *Ureaplasma urealyticum* su urogenitalni uzročnici upala i spolno prenosivih bolesti (STD). Genitalna mikoplazma stvara kroničnu upalu mokraćno-spolnog sustava i amnijskih ovoja, a *Ureaplasma* može inficirati amnijsku vreću s klinički tihim kroničnim korioamnionitisom s karakteristično snažnim upalnim odgovorom (173-176).

Neki virusi mogu biti teratogeni i mutageni. Tako je *comet* testom ispitana teratogenost i mutagenost virusa influenze A2HK/68 na kulturi stanica i leukocitima periferne krvi ljudi (177).

U našem je radu pokazana prisutnost specifičnih protutijela IgM za CMV u 31% ispitanika i 68% ispitanica. Specifična protutijela IgG za CMV nađena su u 67,7% i muških i 74,4% ženskih ispitanika od čega su čak u 13% i 11% bila izrazito povišena, čak do 100.

U zemljama u razvoju gotovo je svaka odrasla osoba inficirana s CMV-om, dok je u razvijenim zemljama zaraženo 50% odraslog stanovništva. Oko 40-70% žena prebolilo je bolest u fertilnoj dobi, a u populaciji nalazimo 3-5% inficiranih trudnica. Smatra se da se oko 1% (0,2-2,4%) plodova zarazi s CMV-om intrauterino. Infekcija može nastupiti i u ploda kod kojeg je primoinfekcija majke nastupila davno prije, a u trudnoći je došlo do reaktivacije infekcije. Oko 60% seropozitivnih majki prenesu CMV na svoju djecu cerviko-vaginalnim sekretom, a 50% mlijekom. Postnatalno se inficira oko 4% djece mlađe od 5 godina i 15-30% djece u dobi od 5-15 godina. Kasnije se osobe mogu zaraziti spolnim putem jer se CMV nalazi u spermi, cervikalnom sekretu i krvlju i krvnim pripravcima (leukociti, transplantirani organi). Rizik za fetus kod primarne infekcije je 40%, a kod reinfekcije < 1%. Primarnu infekciju prati porast i IgM i IgG protutijela. Povišena razine IgG protutijela može biti odraz primarne i rekurentne infekcije, što zahtjeva poseban oprezan pri tumačenju nalaza. Protutijela IgM pojavljuju se 4-16 tjedana nakon akutne faze i simptomske i asimptomatske primarne infekcije odraslih. Protutijela IgG ostaju prisutna čitav život. Protutijela IgM se rijetko nalaze (0,2-1%) u bolesnika s rekurentnom

infekcijom. Analizom spontano pobačenih plodova dokazano je da se posteljica inficira prije embrija ili fetusa i to majčinom krvlju izravno preko citotrofoblasta. Perikonceptualna primarna infekcija s CMV-om ima teže posljedice za plod nego prekonceptualna primarna infekcija. Prisustvo CMV u inseminatu može biti uzrok neuspjele asistirane oplodnje. Isto tako, CMV može inficirati unutarnje genitalne organe muškarca te izazvati uretritis i prostatitis, akutni i kronični (46). U 69% slučajeva prirodno stečeni imunitet smanjio je rizik od kongenitalne infekcije CMV-om u sljedećoj trudnoći. Opisana je značajnija povezanost titra protutijela IgG ili IgM u supruga s infekcijom nego pojava serokonverzije u majke, što upućuje na važnost seksualnog prijenosa u patogenezi kongenitalne CMV infekcije. U žena s generaliziranim neimunim fetalnim hidropsom nađena je povišena razina protutijela IgM i IgG za CMV i parvo B19 kao rezultat reaktivacije majčine kronične CMV infekcije tijekom trudnoće. Analizom prisutnosti CMV-a u spontanim pobačajima pokazano je da virus prvo zarazi posteljicu, potom embrio ili fetus (34, 41, 178-186).

U slučaju virusa EBV prisutnost protutijela IgM nađena je u 11% ispitanica i još manjem broju ispitanika (6%). Međutim, specifična protutijela IgG nađena su u većem broju ispitanica od čega su u 20% bila izrazito povišena (više od 400). Ova su protutijela bila izrazito povišena (više od 400) u 47% muškaraca. Važno je naglasiti da su u 43 ispitanice nađena i IgG protutijela za EA. IgG protutijela za EA nađena su u 5 ispitanika. Ovaj nalaz tumačimo kao dokaz reaktivacije infekcije latentnim virusom EBV.

Epstein-Barr-ov virus (EBV) ima sve osobine herpes virusa, ali se od svih herpes virusa čovjeka razlikuje nekim antigenskim i biološkim osobinama. EBV inficira B limfocite vezanjem na specifične receptore. Epidemije se obično javljaju u proljeće i jesen, dok sporadični slučajevi nisu vezani za godišnje doba. Infekcija se obično javlja u djece školske dobi i mlađih odraslih, većinom u dobi od 15 do 25 godina. Bolest se prenosi od čovjeka do čovjeka kapljičnim putem.

Smatra se da se EBV nakon infekcije, bilo latentne ili manifestne, može dugo, možda i doživotno, zadržati u epitelu orofarinksa i izlučivati slinom. Ti ljudi su stalni izvor zaraze za neimune. U zemljama s lošim socijalno-ekonomskim prilikama, zbog niskog higijenskog standarda, do infekcije dolazi u ranoj dječjoj dobi i u toj dobi prolazi najčešće latentno ili se manifestira samo blagim i nekarakterističnim pojavama bolesti. U ekonomski razvijenim zemljama, s višim higijenskim standardom, infekcije EBV-om se češće događaju tek u školskoj dobi ili kasnije. Tada se obično manifestira kliničkom slikom infekcijske mononukloze. Malo je spoznaja o transplacentarnom prijenosu primarne ili reaktivacijske infekcije EBV-om s majke na fetus. Za svaki slučaj trudnice ne bi trebale biti u blizini akutno bolesne osobe s infekcijskom mononukleozom, a niti tijekom serokonverzije protutijela ili prisutnosti EA protutijela planirati novu trudnoću. Kada se majka zarazi tijekom trudnoće moguće su malformacije i smrt ploda (34).

Iako se, do samo prije desetak godina, smatralo da virus EBV ne prolazi placentarnu barijeru te nije uzrokom intrauterine infekcije koja bi uzrokovala spontani pobačaj, danas su spoznaje sasvim drugačije. EBV može proći placentarnu barijeru, iako je takav prijelaz rijedak i do sada opisan u samo nekoliko slučajeva. Iako EBV ne uzrokuje bitno oštećenje embrija ili fetusa, on inficira placentu i stvara upalne promjene stanica decidue i korionskih resica (187).

Metilacija CpG područja posreduje, između ostalog, smanjenju i/ili dokidanju ekspresije pojedinih gena. Neki herpes virusi smanjuju stupanj metilacije CpG što znači da su stanice inficirane ovim virusima aktivne u metilaciji. S obzirom da je DNA, koja nastaje tijekom litičke infekcije, uglavno nemetilirana, vjerojatno je da se metilacija javlja u stanicama u kojima je virus latentan. Usprkos velikih razlika u sastavu nukleotida virusa EBV i HVS (herpes virus saimiri) oba su CpG-«suprimirana» u većini njihovih kodirajućih sekvenci, što je u skladu njihovoj sposobnosti postojanja u stanicama u episomalnom obliku. Suprotno tome, virusi HSV-1 i HVZ nisu CpG-«suprimirani», što znači da su ti virusi latentni u tkivima koja se ne dijele i vrlo slabo

podliježu *de novo* metilaciji. Također je zanimljivo da je CMV suprimiran samo u području svojih glavnih ranih gena. Stoga proizlazi da su stanice uključene u latentnu infekciju virusom CMV sposobne barem djelomično provesti *de novo* metilaciju (187).

Embriji sisavaca eksprimiraju očeve antigene histokompatibilnosti koji ih čine potencijalnom metom majčinog imunološkog sustava. Iako sam antigen može proći trofoblast i ući u krvotok majke on ne može pokrenuti imunološku reakciju. Može je pokrenuti samo onda ako je prerađen i izložen na antigen prezentirajućim stanicama. Na sreću, ovakve stanice ne mogu proći posteljicu i ući u krvotok majke, pa tako ne mogu pokrenuti imunosnu reakciju u majci. Međutim, moguće je pretpostaviti da postoji takvo patološko stanje u okviru kojeg je trofoblastna barijera oštećena. Npr. lokalna infekcija može potaknuti sintezu citokina koji potiču ekspresiju antigena histokompatibilnosti na trofoblastima. U takvom slučaju stanice trofoblasta su podložne smrtonosnom djelovanju stanica LAK (od engl. *lymphokine active killers*). Iako su u uterusu nekih vrsta nađene NK stanicama slične stanice one nisu imale LAK aktivnost. Štoviše, u uterusu nisu opaženi u značajnijim količinama, ni IL-2 ni IL-12 za koje je poznato da stimuliraju razvitak LA stanica iz NK stanica (42, 188).

Održavanje latentnog stanja virusa EBV u stanici domaćina omogućeno je djelovanjem virusnog anti-apoptotskog proteina sličnog staničnom apoptotskom proteinu Bcl-2 (vBcl-2s) (188). Viralni protein EBNA1, koji pričvršćuje episomalni oblik virusa na kromosome u mitozu, posreduje održavanju virusa u latentnom stanju (189).

Limfociti B čovjeka zaraženi *Mycoplasma fermentans* pojačano proliferiraju. Zaražene stanice iskazuju protein koji reagira s unutarstaničnom domenom receptora za EBV. Ovo pokazuje da *Mycoplasma fermentans* dodatno potiče proliferaciju limfocita B vezanjem za receptore EBV-a (190).

Kim i suradnici su pokazali snažnu povezanost između statusa metiliranosti i

imunoreaktivnosti proteina p16 i prisutnosti virusa EBV u stanicama invazivnog SCC (cerviksa uterusa) i uznapredovalijih stadija CIN-a. Ovo pokazuje da EBV i gen *p16* djeluju sinergistički u deregulaciji staničnog ciklusa (191).

Osim određivanja protutijela za specifične antigene virusa CMV i EBV u nekih je žena i muškaraca određena i prisutnost/odsutnost protutijela i za specifične antigene sljedećih mogućih teratogenih mikroorganizama: *Toxoplasma gondii*, *virus rubeole*, HSV tip 1 i 2, HHV6, parvo B19, VZV, virus parotitisa, *listeria monocytogenes*, adenovirus, RSV, *coxsackie virus*, virus influenzae A, virus morbila.

Nađena je prisutnost specifičnih IgM-protutijela manjeg broja ispitanika nađena je Njihova je prisutnost statistički značajno veća u žena nego u muškaraca, dok je za HSV-2 nađeno suprotno.

U većeg broja ispitanika nađena su protutijela IgG za HSV-1 u muškaraca i žena, ali statistički je značajno veća učestalost protutijela IgG za HSV-2 u muškaraca.

Veća je učestalost osoba seropozitivnih na virus HSV u sredinama s većom naseljenošću i nižim socijalnim razvojem. Kad je jednom zaražen, čovjek nosi virus u latentnom obliku. U razdobljima oslabljene imunosne reaktivnosti, nekih drugih infekcija ili različitim vrstama stresa, virus se reaktivira. Genitalna infekcija s HSV-2 najčešća je u adolescenata. Prenosi se spolnim putem. Oko 10-25% genitalnih infekcija uzrokovane su HSV tipom 1. Opisani su i slučajevi reaktivacije subkliničkog genitalnog herpesa i transplacentarnog prijenosa uslijed akutnog majčinog stresa.

Virusi HSV koji posjeduju tzv. *latency-associated transcript (LAT)* gen blokiraju apoptozu u neuronima kunića, LAT stoga promovira preživljenje virusom HSV-1 inficiranih neurona (34, 192-194).

U ovoj retrospektivnoj analizi bilo je uključeno 258 bračnih parova koji su, u razdoblju od

1983. do 2001. godine, zatražili genetski savjet. U ovih je parova ukupno zabilježeno 574 spontana pobačaja. Analiziralo je 282 arhivska uzorka (parafinske kocke), a 260 uzoraka posteljica analizirano je metodom protočne citometrije. U 23% uzoraka nađena je aneuploidija ili tetraploidija.

Podatke o patohistološkom nalazu posteljice nađeni su za 414 uzoraka. U 61 uzorku nisu nađene ozbiljnije patohistološke promjene (uredan nalaz). U preostalih 353 opisa nađene su različite promjene.

Uzorci su raspoređeni, prema patohistološkom opisu, u nekoliko skupina i praćeni su s obzirom na prvi, drugi, treći i četvrti pobačaj. Najčešći opisi u posteljicama pobačenih plodova bili su upalni elementi (leukociti, granulociti, limfociti), degenerativno tkivo i hidropske promjene.

Degenerativne promjene (D) najčešće su u prvom pobačaju, a potom slijede upalne (U) i hidropske (H) promjene. U drugom pobačaju i dalje su na prvom mjestu degenerativne promjene ali iza njih slijede hidropske pa tek potom upalne promjene. Razmatrajući gore navedene rezultate, vezane uz patohistološki opis, s patologom-placentologom, zaključili smo da opis degenerativne promjene (D) može značiti blaži oblik hidropskih promjena, manju fibrozu resica, slabiju vaskularizaciju, pojedinačne nekrotične resice najčešće uklopljene u obilniji perivilozni fibrin. Prema tome, D znači blaži oblik H, ali sadrži u sebi i F, i V, i N, i Trof.

Možemo zaključiti kako je struktura patoloških nalaza značajno različita isključivo za nalaz H (hidropski) kod drugog spontanog pobačaja u odnosu na prvi.

Van Lijnschoten i suradnici uspoređivali su veličinu korionskih resica i proliferaciju trofoblasta u uzorcima spontanog pobačaja koji su imali abnormalnosti kromosoma. Našli su da triploidni uzorci imaju nešto veće resice (veličina resica je u pozitivnom odnosu s gestacijskom dobi). Međutim, veličina resica smanjuje se kod trisomičnih uzoraka (195).

Jindala i suradnici, u preglednom članku, prikazuju popis svih značajnih studija (objavljenih tijekom 2005. godine) rutinskog histopatološkog ispitivanja pobačenih plodova bolesnica s ponovljenim spontanim pobačajima. Ovdje se nalaze opisi slični onima pokazanim u našem radu. Međutim, ni primjenom patohistološke analize ni dodatnim imunološkim analizama (KN-stanice, HLA-G ekspresija ili IgG odlaganje) ne mogu se postaviti neki ustaljeni kriteriji koji bi bili korisni za postavljanje kliničke dijagnoze i etiologije pobačaja (196, 197).

Noviji radovi prikazuju ploidnost raznim metodama, najčešće protočnom i slikovnom citometrijom, CGH-om i FISH-om. Primjenom većeg broja metoda povećava se i broj dijagnosticiranih aneuploidnih pobačenih plodova (198).

Placentni interleukin-6 nađen je tijekom intrauterine infekcije a ne poroda (199). Nuovo i suradnici su pokazali da je tijekom intrauterinih infekcija enterovirusima/coxsackie pojačana ekspresija citokina (TNF α) u tkivu posteljice i slezeni ploda (200).

U posteljicama pet majki, koje su oboljele od mononukleoze u 2. mjesecu trudnoće, nađene su posebne promjene kao npr. *endovaskulitis* i *perivaskulitis* resica udružen s vaskularnom obliteracijom mononuklearima i velikim vakuoliziranim stanicama poput plazma stanica. *Miokarditis* je nađen u tri fetusa (201). Veći broj stanica u apoptozi nađen je u stromi pobačene posteljice s abnormalnim kromosomima u usporedbi s posteljicama s normalnim brojem kromosoma (202).

Danas se ispituju geni i njihovi polimorfizmi vezani uz regulaciju razvitka blastociste, implantaciju i fetalni rast, kao što su npr. geni za citokine, hormone te čimbenike transkripcije i angiogeneze (203, 204). Danas se osim karcinoma i prekanceroze vrata maternice, navodi i mogućnost pojave gubitka trudnoće zbog prisustva i/ili infekcije s nekim tipovima HPV-a (34). Metodom lančane reakcije polimerazom i metodom hibridizacije *in situ* početnicama specifičnim

za HPV u uzorcima DNA izoliranim iz tkiva posteljice, nije dokazana prisutnosti HPV-a.

Jednako našim rezultatima (odsutnost genoma virusa HPV u pobačenom materijalu), našli su Sifiakis i suradnici (40). Suprotno tome, Hermonat i suradnici i Genest i suradnici našli su prisutnost genoma HPV-a u materijalu pobačenom tijekom prvog trimestra trudnoće i trofoblastu (58, 59, 205).

Temeljem opisanih rezultata, a s obzirom na postavljenu hipotezu, možemo ustvrditi sljedeće:

1. Dva uzastopna događaja uzrokuju aneuploidiju koja za posljedicu ima spontani pobačaj
2. “Prvi udarac” predstavljaju prethodne bolesti, naročito kronične infekcije mokraćnog i spolnog sustava, koje stvaraju predispoziciju prema spontanim pobačajima
3. „Drugi udarac” je primarna infekcija ili reaktivacija EBV žene i/ili muškarca
4. Značajan je i dobiveni podatak o učestalosti prethodnih spontanih pobačaja kod srodnika u II generaciji, pa bi svakako trebalo nastaviti istraživanje i utvrditi i postojanje obiteljske sklonosti ka spontanim pobačajima.

Time smo potvrdili postavljenu hipotezu „dvostrukog udarca”, ali obrnutim redoslijedom događaja nego što je bila naša prva hipoteza. Iako nismo našli potvrdu prisustva virusa HPV u analiziranom tkivu iz podataka se vidi da i drugi virusi (CMV, HSV2) imaju utjecaja na ove događaje pa i HPV može biti jedan od njih.

“Drugi udarac” (EBV i drugi virusi) potiču niz molekulskih i imunskih reakcija, a također uzrokuju promjene na diobenom vretenu za vrijeme mejoze ili u kasnijim mitotičkim diobama. Aneuploidiju smo dokazali u 23% slučajeva.

Razmišljajući o razvitku multifaktorske bolesti, što učestali spontani pobačaji s genetskog aspekta jesu, jer slijede tip nemendelskog nasljeđivanja bolesti (osim onih koji imaju dokazan uzrok u nasljednim genima ili kromosomskim promjenama). Za realizaciju „dva udarca” podlogu možda čini oštećena mreža citokina (206-210) i kronična upala odnosno manjak folata koji igraju vrlo važnu ulogu u sprječavanju lomova kromosoma i hipometilacije DNA. Manjak ovog vitamina može uzrokovati demetilaciju heterokromatina što pak uzrokuje defekte strukture centromera, a to uzrokuje nenormalnu raspodjelu repliciranih kromosoma za vrijeme diobe (211). U najnovijoj literaturi iz listopada 2007. godine nalazimo potvrde o povezanosti kronične upale mokraćno-spolnog sustava i kod muškaraca s neplodnošću (212). Aziz i Agrawal upozoravaju na molekulsku osnovu muške infertiliteta, tj. oštećenja spermija koja su najvjerojatnije povezana s oksidativnim stresom, apoptozom i oštećenjem kromatina, te pozivaju laboratorije diljem svijeta na istraživanja u tom smjeru (213). Tijekom izrade ovog rada nove spoznaje u suvremenoj ginekologiji i genetici uklopile su se u teoriju „dva udarca“ i značajnu ulogu virusa u nastanku *de novo* promjene aneuploidije kod zdravih mladih roditelja s urednim konstitucijskim kariotipom.

7. ZAKLJUČCI

Temeljem opisanih rezultata, a s obzirom na postavljene hipoteze, možemo zaključiti sljedeće:

1. U razdoblju od 1997. do 2001. godine utvrđena je povećana učestalost posjeta genetskom savjetovalištu u odnosu na razdoblje 1987. – 1997. godine. Parovi su se javljali najčešće nakon dva, a neki i nakon prvog odnosno tek nakon trećeg spontanog pobačaja. Ne postoji značajna razlika u tjednima u kojima se zbio prvi, drugi, treći i četvrti pobačaj. Najveći broj pobačaja nastupio je između 8. i 10. tjedna trudnoće tj. u prvom trimestru, prije završetka organogeneze.
2. Nema značajne razlike između prosječnih godina žena (29,4) i muškaraca (32,3) za bilo koji broj spontanih pobačaja u ovoj skupini. Ispitivana skupina žena imala je prosječnu dob od 29,4 godine pa možemo kazati da poznati „maternal age effect“ u ovoj skupini nije prisutan.
3. Srodnici u II generaciji ispitanika imaju dvostruko veći broj spontanih pobačaja od onih u općoj populaciji, što je odraz nasljedne sklonosti za pobačaj u tih obitelji.
4. I muškarci i žene imali su česte infekcije mokraćnog i/ili spolnog sustava, pa smo zaključili da promjene nastale zbog kronične upale imaju podjednaku važnost kada su prisutne u oba spola.
5. Struktura patohistoloških nalaza značajno je različita isključivo za opis hidropskih promjena kod drugog spontanog pobačaja u odnosu na prvi. To objašnjavamo dužim

djelovanjem kroničnih upalnih čimbenika na plod u prvih 10 tjedana gestacije.

6. Aneuploidija ili tetraploidija nađena je u 23% uzoraka posteljica, što je manje od poznatih podataka ispitivanja pobačaja citogenetskim ili molekulskim metodama, ali metodom protočne citometrije jedino je bilo moguće retrospektivno analizirati patohistološke preparate uklopljene u parafin od 1987.-2001. godine.
7. Postavili smo teoriju da dvije uzastopne promjene (udarca) uzrokuju aneuploidiju koja za posljedicu ima spontani pobačaj. U tkivu posteljice nismo dokazali prisutnost HPV-a, pa stoga možemo odbaciti hipotezu o HPV-u kao prvoj promjeni (udarcu) u nastanku aneuploidije.
8. Na kraju istraživanja smo pokazali da “prvi udarac” predstavljaju prethodne bolesti, naročito upale mokraćnog i spolnog sustava u onih bračnih parova koji imaju obiteljsku sklonost za spontane pobačaje.
9. U ispitanika je pronađeno prisustvo protutijela za neke viruse (EBV, CMV i HSV-2), pa smo zaključili da primarna infekcija ili reaktivacija EBV-a predstavlja drugi udarac.
10. Ispitanici u konstitucijskim karitipovima imaju „varijacije u populaciji” tj. polimorfizme, naročito pericentričnu inverziju kromosoma 9 i višak heterokromatina na kromosomu 9. To je specifično obilježje ispitivane populacijske skupine u južnoj Hrvatskoj, za razliku od podataka iz Rijeke gdje je u spontanim pobačajima bilo više 16qh+. Smatramo da su polimorfizmi unutar centromerične regije u uskoj vezi s mehanizmima epigenetske kontrole, te pod djelovanjem nekih vanjskih čimbenika (virusi, kronična upala, oštećenje ciotkinske mreže, manjak folata) mogu imati direktan utjecaj na metilaciju i diobeno vreteno, što u konačnici može rezultirati nerazdvajanjem tj. aneuploidijom.
11. Učestali spontani pobačaji s genetskog aspekta slijede tip nemendelskog načina nasljeđivanja, to su poligenske bolesti.

8. SAŽETAK

Pobačaj je najčešća komplikacija trudnoće. Rizik za svaki sljedeći povećava se s brojem prijašnjih pobačaja. Izgleda da su aberacije kromosoma i virusne infekcije, posebice one nastale neposredno ili tijekom ranog perioda trudnoće na prvom mjestu, od brojnih mogućih uzroka. Preranom prekidu trudnoće doprinose i različiti vanjski čimbenici, posebice neprimjereni radni uvjeti.

Cilj istraživanja bio je ispitati hipotezu da su dvije promjene odgovorne za nastanak aneuploidija koje rezultiraju spontanom pobačajem. Prvi događaj bi bile ranije bolesti mokraćno-spolnog sustava ispitanika kao i spontani pobačaji u II generaciji srodnika što stvara predispoziciju prema spontanom pobačajima. Drugi bi događaj bio kronično prisustvo virusa EBV u žena i muškarca.

Nađeno je da nema značajne razlike između prosječnih godina žena i muškaraca za bilo koji broj spontanih pobačaja te da starost žena ne utječe na učestalost pobačaja. I muškarci i žene imali su ranije infekcije mokraćnog i/ili spolnog sustava. Srodnici u II generaciji i žena i muškaraca imali su dvostruko veći broj spontanih pobačaja nego opća populacija (prvi udarac). Nađene su varijacije u populaciji (per inv 9 i 9qh+) u konstitucijskim kariotipovima ispitanika. Pronađeno je, u ispitanika, prisustvo protutijela za neke viruse (EBV, CMV i HSV-2). Reaktivacija latentne infekcije s EBV-om predstavlja drugi udarac. Aneuploidija ili tetraploidija nađena je u 23% uzoraka. Nije dokazana prisutnost HPV-a u tkivu posteljice.

Potvrđena je postavljena hipoteza o dvostrukom udarcu. Nije potvrđena hipoteza o ulozi HPV-a kao prvog udarca u nastanku aneuploidije. Dokazano je da EBV i drugi mikroorganizmi mogu djelovati kao "drugi udarac", koji će započeti niz molekularnih i imunoloških događanja i uzrokovati promjene na diobenom vretenu za vrijeme mejoze ili u kasnijim mitotičkim diobama.

9. SUMMARY

The importance of DNA analysis of the human papilloma virus in patohystological material of spontaneous abortions with aneuploidy in parents with normal constitutional karyotypes

An abortion is the most frequent complication of pregnancy. Among other various causes, it seems that chromosome aberrations and viral infections come first. The purpose of this research is to establish the hypothesis that two hits are responsible for aneuploidy which results in spontaneous abortion. The first hit could have been triggered by patient's former diseases of urinary and/or genital system. The number of spontaneous abortions recorded in their siblings of second generations creates predisposition that may end with termination of pregnancy. The second hit is usually triggered by chronic presence of EBV virus in male or/and female partner. It has been demonstrated that there is no significant relation between the age of male or female partners and the number of spontaneous abortions. Both males and females had former urinary or/and genital infections and the number of spontaneous abortions among the siblings of second generation is twice as high in relation to average population. Variations in constitutional karyotypes (per inv 9, 9qh+) are also evident as well as presence of antibodies for EBV, CMV, or HSV2 viruses. Reactivation of latent EBV infection provides possibility for second hit. Aneuploidy or tetraploidy is found at 23% of samples. The presence of HPV genome in placenta tissue is not verified. Although we could not verify the presence of HPV virus in analysed tissue, it is clearly evident from statistical data that EBV and other viruses triggered the second hit, so it is possible that HPV could be one of triggers in the theory of two hits.

Therefore we think that the presumed hypothesis of two hits is clearly established. The second hit causes a series of molecular and immunological changes, including changes in spindle apparatus during meiosis or in later mitotic divisions.

10. LITERATURA

1. Gardner RJM, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. 5. izd. Velika Britanija: Oxford University Press; 2004, str. 22-46; 83-87; 95; 291-300; 339-359.
2. Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF i sur. Williams Obstetrics. 20. izd. Connecticut, SAD: Prentice- Hall International INC: 1997, str. 579-605.
3. Menasha J, Levy B, Hirschhorn K, Kardon NB. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study. *Genet Med* 2005; 7: 251-63.
4. Daniely M, Barkai G, Goldman B, Aviram-Goldring A. Detection of numerical chromosome aberrations by comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 1999; 19: 100-4.
5. Qumsiyeh MB. Chromosome abnormalities in the placenta and spontaneous abortions. *J Matern Fetal Med* 1998; 7: 210-2.
6. Lamond AI, Eamshaw WC. Structure and function in the nucleus. *Science* 1998; 280: 547-53.
7. Gisselsson D, Hoglund M. Putting chromosome aberrations on the map. *Trends Genet* 2000; 16: 420-2.
8. Abruzzo MA, Hassold TJ. Etiology of nondisjunction in humans. *Environ Mol Mutagen* 1995; 25 (Suppl 26): 38-47.
9. Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J i sur. A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat Genet* 2002; 31: 241-7.
10. Warburton D, Kinney A. Chromosomal differences in susceptibility to meiotic

- aneuploidy. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28: 237-47.
11. Day T, Taylor PD. Chromosomal drive and the evolution of meiotic nondisjunction and trisomy in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2361-5.
 12. Wyrobek AJ, Aardema M, Eichenlaub-Ritter U, Ferguson L, Marchetti F. Mechanisms and targets involved in maternal and paternal age effects on numerical aneuploidy. *Environ Mol Mutagen* 1996, 28: 254-64.
 13. Bishop JB, Dellarco VL, Hassold T, Ferguson LR, Wyrobek AJ, Friedman JM. Aneuploidy in germs cells: etiologies and risk factors. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28: 159-66.
 14. Van Opstal D, Van den Berg C, Deelen WH i sur. Prospective prenatal investigations on potential uniparental disomy in cases of confined placental trisomy. *Prenatal Diagn* 1998; 18: 35-44.
 15. Qumsiyeh MB. Impact of rearrangments on function and position of chromosomes in the interphase nucleus and on human genetic disorders. *Chromosome Res* 1995; 3: 455-65.
 16. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA i sur. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 1997; 106: 348-60.
 17. Hassold TJ, Pettay D, Freeman SB, Grantham M, Takaesu N. Molecular studies of non-disjunction in trisomy 16. *J Med Genet* 1991; 28: 159-62.
 18. Zaragoza MV, Millie E, Redline RW, Hassold TJ. Studies of non-disjunction in trisomies 2, 7, 15 and 22; does the parental origin of trisomy influence placental morphology? *J Med Genet* 1998; 35: 924-31.
 19. Van Blerkom J. The infulence of intrinsic and extrinsic factors on the developmental

- potential and chromosomal normality of human oocyte. *J Soc Gynecol Invest* 1996; 3: 3-11.
20. Ferguson LR, Allen JW, Mason JM. Meiotic recombination and germ cell aneuploidy. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28: 192-210.
 21. Preston RJ. Aneuploidy in germ cells: disruption of chromosome mover components. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28: 176-81.
 22. Angell R. First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 23-32.
 23. Litmanovitch T, Altaras MM, Dotan A, Avivi L. Asynchronous replication of homologous alpha-satellite DNA loci in man is associated with nondisjunction. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 81: 26-35.
 24. De Capoa A, Di Leandro M, Grappelli C i sur. Computer-assisted analysis of methylation status of individual interphase nuclei in human cultured cells. *Cytometry* 1998; 3: 85-92.
 25. Kline J, Kinney A, Levin B, Warburton D. Trisomic pregnancy and earlier age at menopause. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 395-404.
 26. Hassold TJ. The origin of human nondisjunction: two hits to trisomy. Second European Cytogenetic Congress, Vienna 1999, Knjiga sažetaka: str. 9.
 27. Yeazel MW, Buckley JD, Woods WG, Ruccione K, Robinson LL. History of maternal fetal loss and increased risk of childhood acute leukemia at an early age. A report from Childrens Cancer Group. *Cancer* 1995; 75: 1718-27.
 28. Kline J, Levin B, Silverman J i sur. Caffeine and spontaneous abortion of known karyotype. *Epidemiology* 1991; 2: 409-17.
 29. Zenzes MT, Wang P, Casper RF. Cigarette smoking may affect meiotic maturation of human oocytes. *Human Reprod* 1995; 10: 3213-17.

30. Mailhes JB. Important biological variables that can influence the degree of chemical-induced aneuploidy in mammalian oocyte and zygotes. *Mutat Res* 1995; 339: 155-76.
31. Aardema MJ, Albertini S, Arni P i sur. Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. *Mutat Res* 1998; 410: 3-79.
32. Neubert D. Reproductive toxicology: the science today. *Teratog Carcinog Mutagen* 2002; 22: 159-74.
33. Jacquet P, Adriaens I, Buset J, Neefs M, Vankerkom J. Cytogenetic studies in mouse oocytes irradiated in vitro at different stages of maturation, by use of an early preantral follicle culture system. *Mutat Res* 2005; 583: 168-77.
34. Čulić V. Dijagnostika i praćenje intrauterinih infekcija. *Paediatr Croat* 2004; 48 Suppl 1: 180- 91.
35. Morrison RP. New insights into a persistent problem-chlamydial infections. *J Clin Invest* 2003; 111: 1647-9.
36. Van Lijnschoten G, Stals F, Evers JL, Bruggeman CA, Havenith MH, Geraedts JP. The presence of cytomegalovirus antigens in karyotyped abortions. *Am J Reprod Immunol* 1994, 32: 211-20.
37. Čulić V, Lozić B. Infertilnost i varijante centromerične regije kromosoma 9 u korelaciji s infekcijama. I hrvatski endokrinološki kongres, Trakošćan, 1-4 lipnja, 1995, Knjiga sažetaka: str.46.
38. Sifakis S, Koumantakis E, Koffa M, Ergazaki M, Spandidos DA. Detection of herpes simplex virus (HSV) in aborted material using the polymerase chain reaction technique. *Gynecol Obstet Invest* 1998; 45: 109-15.
39. Szkaradkiewicz A, Pieta P, Tulecka T, Breborowicz G, Slomko Z, Strzyzowski P. The

diagnostic value of anti-CMV and anti-HPV-B19 antiviral antibodies in studies on causes of recurrent abortions. *Ginekol Pol* 1997; 68: 181-6.

40. Sifakis S, Ergazaki M, Sourvinos G, Koffa M, Koumantakis E, Spandidos DA. Evaluation of Parvo B19, CMV and HPV viruses in human aborted material using the polymerase chain reaction technique. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 76: 169-73.

41. Presečki V, Mlinarić-Galinović G, Punda-Polić V, Lukić A, ur. *Virologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2002.

42. Chee M, Barrell B. Herpesviruses: a study of parts. *Trends Genet* 1990; 6: 86-91.

43. Bower JR, Mao H, Durishin C i sur. Intrastrain variants of herpes simplex virus type 1 isolated from a neonate with fatal disseminated infection differ in the ICP34.5 gene, glycoprotein processing, and neuroinvasiveness. *J Virol* 1999; 73: 3843-53.

44. Morand P. Natural history of HSV1 and HSV2 infection. Asymptomatic viral excretion. Mother-infant transmission. Indirect transmission. *Ann Dermatol Venerol* 2002; 129: 577-85.

45. Diosi P. Cytomegalovirus (CMV) in cervical secretion and breast milk. A thirty years perspective. *Roum Arch Microbiol Immunol* 1997; 56: 165-78.

46. Levy R, Najjoullah F, Keppi B i sur. Detection of cytomegalovirus in semen from a population of men seeking infertility evaluation. *Fertil Steril* 1997; 68: 820-5.

47. Lazzarotto T, Spezzacatena P, Varini S i sur. Anticytomegalovirus (anti-CMV) immunoglobulin G avidity in identification of pregnant women at risk of transmitting congenital CMV infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 127-9.

48. Barbi M; Binda S; Primache V; Novelli C. Cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes of infants with congenital or postnatal infection. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 898-903.

49. Fowler KB, Stagno S, Pass RF. Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection. *JAMA* 2003; 289: 1008-11.
50. Zinkernagel RM. Immunology taught by viruses. *Science* 1996; 271: 173-8.
51. Oda T, Imai S, Chiba S, Takada K. Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp85 cannot infect B cells and epithelial cells. *Virology* 2000; 276: 52-8.
52. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *New Engl J Med* 2000; 343: 481-92.
53. Ville Y, de Gayffier A, Brivet F i sur. Fetal-maternal hydrops syndrome in human parvovirus infection. *Fetal Diagn Ther* 1995; 10: 204-6.
54. Skjoldebrand-Sparre L, Tolfvenstam T, Papadogiannakis N, Wahren B, Broliden K, Nyman M. Parvovirus B19 infection: association with third-trimester intrauterine fetal death. *BJOG* 2000; 107: 476-80.
55. Tobiasch E, Rabreau M, Geletneky K i sur. Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *J Med Virol* 1994; 44: 215-22.
56. Hermonat PL, Plott RT, Santin AD, Parham GP, Flick JT. Adeno-associated virus Rep78 inhibits oncogenic transformation of primary human keratinocytes by a human papillomavirus type 16-ras chimeric. *Gynecol Oncol* 1997; 66: 487-94.
57. Burguete T, Rabreau M, Fontanges-Darriet M i sur. Evidence for infection of the human embryo with adeno-associated virus in pregnancy. *Hum Reprod* 1999; 14: 2396-401.
58. Hermonat PL, Kechelava S, Lowery CL, Korourian S. Trophoblasts are preferential target for human papilloma virus infection in spontaneously aborted products of conception. *Hum Pathol* 1998; 29: 170-4.
59. Genest DR, Sun D, Crum CP. Human papillomavirus in spontaneous abortion. *Human Pathol* 1999; 30: 109-11.

60. Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N i sur. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000; 355: 2189-93.
61. Connelly DA, Chan PJ, Patton WC, King A. Human sperm deoxyribonucleic acid fragmentation by specific types of papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 1068-70.
62. Joshi VV. *Handbook of Placental Pathology*. 1 izd. New York: Igaku Shoin Medical Publishers Inc; 1994, str.32-60; 75-81; 96-97.
63. Kalousek DK. *Pathology of Abortion. The Embryo and the Previabile Fetus*. U: Gilbert-Barness E, ur. *Potter's Pathology of the Fetus and Infant*. St. Louis, USA. Mosby company; 1997, str.106-127.
64. Van Belle G, Lloyd DF, Heagerty PJ, Lumley T. *Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences*. Electronic Edition: Wiley; 2004.
65. Dawson B, Trapp RG. *Basic & Clinical Biostatistics*. 3 izd.. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2001.
66. Samonte RV, Conte RA, Ramesh KH, Verma RS. Molecular cytogenetic characterization of breakpoints involving pericentric inversion of human chromosome 9. *Hum Genet* 1996;98:576-80.
67. ISCN (2005): *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Shaffer LG, Tommerup N (izd); S Karger, Basel 2005.
68. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod* 1990; 5: 519-28
69. Lockwood CJ . Prediction of pregnancy loss. *Lancet* 2000; 355: 1292-3.
70. Templado C, Bosch M, Benet J. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111: 199-205.

71. Delhanty JD. Mechanisms of aneuploidy induction in human oogenesis and early embryogenesis. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111: 237-44.
72. Del Porto G, D'Alessandro E, Grammatico P i sur. Chromosome heteromorphisms and early recurrent abortions. *Hum Reprod* 1993; 8: 755-8.
73. Buretic-Tomljanovic A, Rodojic Badovinac A, Vlastelic I, Randic LJ. Quantitative analysis of constitutive heterochromatin in couples with fetal wastage. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38: 201-4.
74. Zagradisnik B, Kokalj-Vokac N. Hypomethylation of alphoid DNA and classical satellite DNA on chromosome 1, 9, 16 and Y in extraembryonic tissue. *Plugers Arch* 2000; 440Suppl 5: R190-2.
75. De Capoa A, Menendez F, Poggesi I i sur. Cytological evidence for 5-azacytidine-induced demethylation of the heterochromatic regions of human chromosomes. *Chromosome Res* 1996; 4: 271-6.
76. Baranov VS, Pendina AA, Kuznetsova TV i sur. Peculiarities of metaphase chromosome methylation pattern in preimplantation human embryos. *Tsitologija* 2005; 47: 723-30.
77. Demburg AF, Sedat JW, Hawley RS. Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation. *Cell* 1996; 86: 135-46.
78. Lu BY, Eissenberg JC. Time out: developmental regulation of heterochromatic silencing in *Drosophila*. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54: 50-9.
79. Bickmore WA, Oghene K. Visualizing the spatial relationships between defined DNA sequences and the axial region of extracted metaphase chromosomes. *Cell* 1996; 84: 95-104.
80. Fernandez JL, Campos A, Lopez-Fernandez C, Gosalvez J, Goyanes V. Difference in constitutive heterochromatin behaviour between human amniocytes and lymphocytes detected

by a sequential in situ exonuclease III digestion-random primer extension procedure. *J Med Genet* 1995; 32: 32-5.

81. Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W. Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia* 1998; 30: 29-35.

82. Zhou J, Chau CM, Deng Z i sur. Cell cycle regulation of chromatin at an origin of DNA replication. *EMBO J* 2005; 24: 1406-17.

83. Doenecke D, Drabent B, Bode C i sur. Histone gene expression and chromatin structure during spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol* 1997; 424: 37-48.

84. Amiel A, Sardos-Albertini F, Fejgin MD, Sharony R, Diukman R, Bartoov B. Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv 9) and C-heterochromatin. *J Hum Genet* 2001; 46: 245-50.

85. Tilgen N, Guttenbach M, Schmid M. Heterochromatin is not an adequate explanation for close proximity of unterphase chromosome 1...Y, 9...Y, and 16...Y in human spermatozoa. *Cell Res Exp* 2001; 265: 283-7.

86. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. *J Pathol* 2002; 196: 1-7.

87. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 2003; 300: 455.

88. Ferguson-Smith AC, Surani MA. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science* 2001; 293: 1086-9.

89. Yasuhara T, Okamoto A, Kitagawa T i sur. FGF7-like gene is associated with pericentric inversion of chromosome 9, and FGF7 is involved in the development of ovarian

cancer. *Int J Oncol* 2005; 26: 1209-16.

90. Brajenovic-Milic B, Petrovic O, Krasevic M, Ristic S, Kapovic M. Chromosomal anomalies in abnormal human pregnancies. *Fetal Diagn Ther* 1998; 13: 187-91.

91. Fryns JP, Van Buggenhout G. Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 81: 171-6.

92. Van de Kaa CA, Hanselaar AG, Hopman AH i sur. DNA cytometric and interphase cytogenetic analyses of paraffin-embedded hydatidiform moles and hydropic abortions. *J Pathol* 1993; 170: 229-38.

93. De Vita R, Calugi A, Cavallo D, Eleuteri P, Vizzone A. Flow cytometric and cytogenetic analyses in human spontaneous abortions. *Hum Genet* 1993; 91: 409-15.

94. Fukunaga M, Ushigome S, Fukunaga M. Spontaneous abortions and DNA ploidy. An application of flow cytometric DNA analysis in detection of non-diploidy in early abortions. *Mod Pathol* 1993; 6: 619-24.

95. Koenig C, Demopoulos RI. Vamvakas EC i sur. Flow cytometric DNA ploidy and quantitative histopathology in partial moles. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12: 235-40.

96. Lorenzato M, Visseaux-Coletto B, Lallemand A, Masure M, Gaillard D. Determination of reliable histological features associated with early triploidy using DNA image cytometry. *Pathol Res Pract* 1995; 191: 1179-85.

97. Rua S, Comino A, Fruttero A, Abrate M. DNA flow cytometric analysis of abortions. A simple method for detection of triploidy and tetraploidy in the trophoblastic cells. *Pathologica* 1995; 87: 107-11.

98. Van de Kaa CA, Robben JC, Hopman AH, Hanselaar AG, Vooijs GP. Complete hydatidiform mole in twin pregnancy: differentiation from partial mole with interphase cytogenetic and DNA cytometric analyses on paraffin embedded tissues. *Histopathology*

1995; 26: 123-9.

99. Jeffers MD, Michie BA, Oakes SJ, Gillan JE. Comparison of ploidy analysis by flow cytometry and image analysis in hydatidiform mole and non-molar abortion. *Histopathology* 1995; 27: 415-21.

100. Van de Kaa CA, Schijf CP, de Wilde PC, Hanselaar AG, Vooijs PG. The role of deoxyribonucleic acid image cytometric and interphase cytogenetic analyses in the differential diagnosis, prognosis, and clinical follow-up of hydatidiform moles. A report from the Central Molar Registration in The Netherlands. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 1219-29.

101. Paradinas FJ, Browne P, Fisher RA, Foskett M, Bagshawe KD, Newlands E. A clinical, histopathological and flow cytometric study of 149 complete moles, 146 partial moles and 107 non-molar hydropic abortions. *Histopathology* 1996; 28: 101-10.

102. Ozeren M, Aydemir V, Tekelioglu Y, Topcuoglu K, Bozkaya H. Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry in anembryonic pregnancy and spontaneous abortions. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 48: 104-7.

103. Eiben B, Bartels I, Bahr-Porsch S i sur. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 656-63.

104. Minelli E, Buchi C, Granata P i sur. Cytogenetic findings in echographically defined blighted ovum abortions. *Ann Genet* 1993; 36: 107-10.

105. Eichenlaub-Ritter U. Parental age-related aneuploidy in human germ cells and offspring: a story of past and present. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28: 211-36.

106. Kaspar HG, Kraemer BB, Kraus FT. DNA ploidy by image cytometry and karyotype in spontaneous abortion. *Hum Pathol* 1998; 29: 1013-6.

107. Simon C, Rubio C, Vidal F i sur. Increased chromosome abnormalities in human

preimplantation embryos after in-vitro fertilization in patients with recurrent miscarriage. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10: 87-92.

108. Carp H, Toder V, Aviram A i sur. Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2001; 75: 678-82.

109. Kalousek DK, Barrett IJ, Gartner AB. Spontaneous abortion and confined chromosomal mosaicism. *Hum Genet* 1992; 88: 642-6.

110. Roland B, Lynch L, Berkowitz G, Zinberg R. Confined placental mosaicism in CVS and pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 1994; 14: 589-93.

111. Griffin DK, Millie EA, Redline RW, Hassold TJ, Zaragoza MV. Cytogenetic analysis of spontaneous abortions: comparison of techniques and assessment of the incidence of confined placental mosaicism. *Am J Med Genet* 1997; 72: 297-301.

112. Van de Kaa CA, Nelson KA, Ramaekers FC, Vooijs PG, Hopman AH. Interphase cytogenetics in paraffin sections of routinely processed hydatidiform moles and hydropic abortions. *J Pathol* 1991;165: 281-7.

113. Baretton GB, Muller M, Wirtz A, Murken J, Arnholdt H. Numerical chromosome aberrations in abortion tissue. Comparison of conventional cytogenetics and interphase cytogenetics in paraffin sections and nuclear suspensions. *Pathologie* 1998; 19: 120-8.

114. Barrett IJ, Lomax BL, Loukianova T, Tang SS, Lestou VS, Kalousek DK. Comparative genomic hybridization: a new tool for reproductive pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: 81-4.

115. Vidal F, Gimenez C, Rubio C i sur. FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15: 310-3.

116. Bell KA, Van Deerlin PG, Haddad B, Feinberg RF. Cytogenetic diagnosis of "normal 46, XX" karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading. *Fertil Steril*

1999; 71: 334-41.

117. Fejgin MD, Pomeranz M, Liberman M, Fishman A, Amiel A. Fluorescent in situ hybridization: an effective and less costly technique for genetic evaluation of products of conception in pregnancy losses. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005; 84: 860-3.

118. Fukunaga M. Immunohistochemical characterization of p57Kip2 expression in tetraploid hydropic placentas. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128: 897-900.

119. Bell KA, Van Deerlin V, Addya K, Clevenger CV, Van Deerlin PG, Leonard DG. Molecular genetic testing from paraffin-embedded tissue distinguishes nonmolar hydropic abortion from hydatidiform mole. *Mol Diagn* 1999; 4: 11-9.

120. Smith MJ, Creasy MR, Clarke A, Upadhyaya M. Sex ratio and absence of uniparental dysomi in spontaneous abortion with normal karyotype. *Clin Genet* 1998; 53: 258-61.

121. Bick RL, Madden J, Heller KB, Toofanian A. Recurrent miscarriage: causes, evaluation, and treatment. *Medscape Womens Health* 1998; 3: 2.

122. Patriarca A, Piccioni V, Gigante V, Parise G, Benedetto C. Recurrent spontaneous abortion. Etiologic factors. *Panminerva Med* 2000; 42: 105-8.

123. Kleinhaus K, Perrin M, Friedlander Y, Paltiel O, Malaspina D, Harlap S. Paternal age and spontaneous abortion. *Obstet Gynecol* 2006; 108: 369-77.

124. Munne S, Sandalinas M, Magli C, Gianaroli L, Cohen J, Warburton D. Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions. *Prenat Diagn* 2004, 24:638-43.

125. Mtiraoui N, Zammiti W, Ghazouani L i sur. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Reproduction* 2006; 131: 395-401.

126. Herman M, Djelmis J, Troselj Z, Ivanisevic M. Pregnancy outcomes in a

patient-heterozygous carrier of R506Q mutation of factor V (Leiden). *Acta Med Croatica* 2006; 60: 277-80.

127. Dimitrova V, Koleva R, Savov A i sur. Successful pregnancy outcome following three severe placental abruptions and intrauterine fetal death in the patient-heterozygous carrier of R506Q mutation of factor V (Leiden). *Akush Ginekol (Sofia)* 2004; 43: 47-54.

128. Rivas F, Davalos IP, Olivares N i sur. Reproductive history in mothers of children with neural tube defect. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 49: 255-60.

129. Sata F, Yamada H, Yamada A i sur. A polymorphism in the *CYP17* gene relates to the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 725-8.

130. Lehrer SP, Schmutzler RK, Rabin JM, Schachter BS. An estrogen receptor genetic polymorphism and a history of spontaneous abortion - correlation in women with estrogen receptor positive breast cancer but not in women with estrogen receptor negative breast cancer or in women without cancer. *Breast Canc Res Treat* 1993; 26: 175-80.

131. Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G i sur. Methionine synthase (MTR) 2756 (A->G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet A*. 2003; 121: 219-24.

132. Crott JW, Mashiyama ST, Ames BN, Fenech M. The effect of folic acid deficiency and MTHFR C677T polymorphism on chromosome damage in human lymphocytes in vitro. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 1089-96.

133. Clark DA, Blois S, Kandil J, Handjiski B, Manuel J, Arck PC. Reduced uterine indoleamine 2,3-dioxygenase versus increased Th1/Th2 cytokine ratio as a basis for occult and clinical pregnancy failure in mice and humans. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54: 203-16.

134. Weber M, Hayem G, DeBandt M i sur. The family history of patients with primary or

secondary antiphospholipid syndrome (APS). *Lupus* 2000; 9: 258-63.

135. Halperin R, Shinnar N, Kronfeld-Schor N, Hadas E. Human decidua-associated protein 200 neutralizes the detrimental effect of serum containing antiphospholipid antibodies on fetal survival in the rat. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55: 246-50.

136. Seoud M, Khalil A, Frangieh A, Zahed L, Azar G, Nuwayri-Salti N. Recurrent molar pregnancies in a family with extensive intermarriage: report of a family and review of the literature. *Obstet Gynecol* 1995; 86: 692-5.

137. Moglabey YB, Kircheisen R, Seoud M, El Mogharbel N, Van den Veyver I, Slim R. Genetic mapping of a maternal locus responsible for familial hydatidiform moles. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 667-71.

138. El-Maarri O, Seoud M, Riviere JB i sur. Patients with familial biparental hydatidiform moles have normal methylation at imprinted genes. *Eur J Hum Genet* 2005; 13: 486-90.

139. Parazzini F, Bocciolone L, Fedele L, Negri E, La Vecchia C, Acia B. Risk factors for spontaneous abortion. *Int J Epidemiol* 1991; 20: 157-61.

140. Pouta A, Jarvelin MR, Hemminki E, Sovio U, Hartikainen AL. Mothers and daughters: intergenerational patterns of reproduction. *Eur J Public Health* 2005; 15: 195-9.

141. Ejaz S, Seok KB, Woong LC. Disruption of normal embryonic angiogenesis by direct exposure of mainstream whole smoke solutions of commercial cigarettes. *Environ Toxicol Pharmacol* 2005; 20: 188-98.

142. D'Souza D, Thomas IM, Das BC. Variation in spontaneous chromosomal damage as a function of biologic rhythms in women. *Hum Genet* 1988; 79: 83-5.

143. Knackstedt MK, Hamelmann E, Arck PC. Mothers in stress: consequences for the offspring. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54: 63-9.

144. Kline J, Hutzler M, Levin B, Stein Z, Susser M, Warburton D. Marijuana and

- spontaneous abortion of known karyotype. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1991; 5: 320-32.
145. Puerto S, Marcos R, Ramirez MJ i sur. Induction, processing and persistence of radiation-induced chromosomal aberrations involving hamster euchromatin and heterochromatin. *Mutat Res* 2000; 469: 169-79.
146. Gardella JR, Hill JA. Environmental toxins associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2000; 18: 407-24.
147. Bienefeld M, Marrett L, Cole D, McLaughlin J. Occupational radiation exposure and risk of spontaneous abortion among medical radiation technologists in Canada. *Am J Epidemiol* 2005; 161: S128.
148. Beetstra S, Thomas P, Salisbury C, Turner J, Fenech M. Folic acid deficiency increases chromosomal instability, chromosome 21 aneuploidy and sensitivity to radiation-induced micronuclei. *Mutat Res* 2005; 578: 317-26.
149. Beetstra S, Fenech M. Folic acid deficiency is genotoxic and increases sensitivity to chromosome damage by gamma radiation. *Asia Pac J Clin Nutr* 2004; Suppl 13: S87.
150. Hjollund NH, Bonde JP, Ernst E, Lindenberg S, Andersen AN, Olsen J. Spontaneous abortion in IVF couples - a role of male welding exposure. *Hum Reprod* 2005; 20: 1793-7.
151. Bellinger DC. Teratogen update: lead and pregnancy. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005; 73: 409-20.
152. Brent RL. Utilization of animal studies to determine the effects and human risks of environmental toxicants (drug, chemicals, and physical agents). *Pediatrics* 2004; 113: 984-95.
153. Grosso LM, Bracken MB. Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes: a review of exposure assessment considerations during pregnancy. *Ann Epidemiol* 2005; 15: 460-6.
154. Sata F, Yamada H, Suzuki K i sur. Caffeine intake, CYP1A2 polymorphism and the

risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 357-60.

155. Cnattingius S, Signorello LB, Anneren G i sur. Caffeine intake and risk of first-trimester spontaneous abortion. *N Engl J Med* 2000; 343: 1839-45.

156. Parazzini F, Chiaffarino F, Chatenoud L i sur. Maternal coffee drinking in pregnancy and risk of small for gestational age birth. *Eur J Clin Nutr* 2005; 59: 299-301.

157. Lashen H, Fear K, Sturdee DW. Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: matched case-control study. *Hum Reprod* 2004; 19: 1644-6.

158. Wennborg H, Magnusson LL, Bonde JP, Olsen J. Congenital malformations relate to maternal exposure to specific agents in biomedical research laboratories. *J Occup Environ Med* 2005; 47: 11-9.

159. Mailhes JB. Important biological variables that can influence the degree of chemical-induced aneuploidy in mammalian oocyte and zygotes. *Mutat Res* 1995; 339: 155-76.

160. Hsieh GY, Wang JD, Cheng TJ, Chen PC. Prolonged menstrual cycles in female workers exposed to ethylene glycol ethers in the semiconductor manufacturing industry. *Occup Environ Med* 2005; 62: 510-6.

161. Dopp E, Schuler M, Schiffmann D, Eastmond DA. Induction of micronuclei, hyperdiploidy and chromosomal breakage affecting the centric/pericentric regions of chromosomes 1 and 9 in human amniotic fluid cells after treatment with asbestos and ceramic fibres. *Mutat Res* 1997; 377: 77-87.

162. Koren A, Ben-Aroya S, Kupiec M. Control of meiotic recombination initiation: a role for the environment? *Curr Genet* 2002; 42: 129-39.

163. Pressinger RW, Sinclair W. Environmental causes of infertility. 1998.

164. Brent RL. Environmental causes of human congenital malformations: the pediatrician's role in dealing with these complex clinical problems caused by a multiplicity of environmental and genetic factors. *Pediatrics* 2004; 113: 957-68.
165. Athanassakis I, Aifantis I, Baritakis S, Farmakiotis V, Koumantakis E, Vassiliadis S. Nitric oxide production by pre-implantation embryos in response to embryotoxic factors. *Cell Physiol Biochem* 2000; 10 : 169-76.
166. Goldberg BB, Alvarado S, Chavez C i sur. Prevalence of periconceptional folic acid use and perceived barriers to the postgestation continuance of supplemental folic acid; survey results from a teratogen information service. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2006; 76: 193-9.
167. Loureiro KD, Kao KK, Jones KL i sur. Minor malformations characteristic of the retinoic acid embryopathy and other birth outcomes in children of women exposed to topical tretinoin during early pregnancy. *Am J Med Genet Part A* 2005, 136: 117-21.
168. Skov T, Maarup B, Olsen J, Rorth M, Winthereik H, Lynge E. Leukaemia and reproductive outcome among nurses handling antineoplastic drugs. *Br J Ind Med* 1992; 49: 855-61.
169. Ault KA, Kelly KA, Ruther PE i sur. *Chlamydia trachomatis* enhances the expression of matrix metalloproteinases in an in vitro model of the human fallopian tube infection. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 1377-83.
170. Bergstrom S. Genital infections and reproductive health: infertility and morbidity of mother and child in developing countries. *Scand J Infect Dis* 1990; 69: 99-105.
171. Draper D, Landers D, Krohr M, Hillier Sh, Wiesenfeld H, Heine R. Levels of vaginal secretory leukocyte protease inhibitor are decreased in women with lower reproductive

infections. Am J Obstet Gynecol 2000; 183: 1243-8.

172. Workowski KA, Levine WC, Wasserheit JN. U.S. Centers for Disease Control and Prevention guidelines for the treatment of sexually transmitted diseases: an opportunity to unify clinical and public health practice Ann Int Med 2002; 137: 255-62.

173. Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert GL. Molecular genotyping of human *Ureaplasma* species based on multiple-banded antigen (MBA) gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol 2000; 50: 1921-9.

174. Neyrolles O, Ferris S, Behbahani N, Montagnier L, Blanchard A. Organization of *Ureaplasma urealyticum* urease gene cluster and expression in a suppressor strain of *Escherichia coli*. J Bacteriol 1996; 178: 647-55.

175. Pollack JD. *Ureaplasma urealyticum*: an opportunity for combinatorial genomics. Trends Microbiol 2001; 9: 169-75.

176. Vijaya LAN, Ramana MV, Vijayashree B, Ahuja YR, Sharma G. Detection of influenza virus induced DNA damage by comet assay. Mutat Res 1997; 442: 53-8.

177. Barfield W, Gardner R, Lett S, Johnsen C. Congenital rubella reinfection in a mother with anti-cardiolipin and antiplatelet antibodies. Pediatr Infect Dis J 1997; 16: 249-51.

178. Revello GM, Zavattoni M, Furione M, Lilleri D, Gorini G, Germa G. Diagnosis and outcome of preconceptional and periconceptional human cytomegalovirus infections. J Infect Dis 2002; 186: 553-7.

179. Eggers M, Metzger C, Enders G. Differentiation between acute primary and recurrent human cytomegalovirus infection in pregnancy, using a microneutralization assay. J Med Virol 1998; 56: 351-8.

180. Cook SM, Himebaugh KS, Frank T. Absence of cytomegalovirus in gestational tissue in recurrent spontaneous abortion. Diagn Mol Pathol 1993; 2: 116-9.

181. Fisher S, Genbacev O, Maidji E, Pereira L. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. *J Virol* 2000; 74: 6808-20.
182. Gaytant MJ, Rours GIJG, Steegers EAP, Galama JMD, Semmekrot BA. Congenital cytomegalovirus infection after recurrent infection: case reports and the review of the literature. *Eur J Pediatr* 2003; 162: 248–53.
183. Numazaki K, Fujikawa T, Chiba S. Relationship between seropositivity of husbands and primary cytomegalovirus infection during pregnancy. *J Infect Chemother* 2000; 6: 104-6.
184. Toth FD, Mosborg-Petersen P, Kiss J i sur. Interactions between human immunodeficiency virus type 1 and human cytomegalovirus in human term syncytiotrophoblast cells coinfecting with both viruses. *J Virol* 1995; 69: 2223-32.
185. Staras SA, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of Cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis* 2006, 43:1143-51.
186. Agvil M, Ornoy A. Herpes simplex virus and Epstein-Barr virus infections in pregnancy: consequences of neonatal or intrauterine infection. *Reprod Toxicol* 2006; 21: 436-45.
187. Wood GW. Is restricted antigen presentation the explanation for fetal allograft survival? *Immunol Today* 1994; 15: 15-8.
188. Altmann M, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis. *PLoS Biol* 2005; 3: e404.
189. Yue W, Shackelford J, Pagano JS. cdc2/cyclin B1-dependent phosphorylation of EBNA2 at Ser243 regulates its function in mitosis. *J Virol* 2006; 80: 2045-50.
190. Balbo M, Barel M, Lottin-Divoux S, Jean D, Frade R. Infection of human B

lymphoma cells by *Mycoplasma fermentans* induces interaction of its elongation factor with the intracytoplasmic domain of Epstein-Barr virus receptor (gp140, EBV/C3dR, CR2, CD21). FEMS Microbiol Lett 2005; 249: 359-66.

191. Kim NR, Lin Z, Kim RK, Cho HY, Kim I. Epstein-Barr Virus and p16INK4A methylation in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the cervix uteri. J Korean Med Sci 2005; 20: 636-42.

192. Mao H, Rosenthal KS. Strain-dependent structural variants of herpes simplex virus type 1 ICP 34.5 determine viral plaque size, efficiency of glycoprotein processing, and viral release and neuroinvasive disease potential. J Virol 2003; 77: 3409–17.

193. Brown ZA, Wald A, Morrow RA, Selke S, Zeh J, Corey L. Effect of serologic status and cesarean delivery on transmission rates of Herpes Simplex Virus from mother to infant. JAMA 2003; 289: 203–9.

194. Lehtinen M, Koskela P, Ogmundsdottir HM i sur. Maternal herpesvirus infections and risk of acute lymphoblastic leukemia in the offspring. Am J Epidemiol 2003; 158: 207-13.

195. Van Lijnschoten G, Arends JW, Thunnissen FB, Geraedts JP. A morphometric approach to the relation of karyotype, gestational age and histological features in early spontaneous abortions. Placenta 1994; 15: 189-200.

196. Jindal P, Regan L, Fourkala EO i sur. Placental pathology of recurrent spontaneous abortions: the role of histopathological examination of products of conception in routine clinical practice: a mini review. Hum Reprod. 2007; 22: 313-6.

197. Thiet MP, Suwanvanichkij V, Hasselblatt K, Yeh J. Apoptosis in human term placenta. A morphological and gene expression study. Gynecol Obstet Invest 2000; 50: 88-91.

198. Chew SH, Perlman EJ, Williams R, Kurman RJ, Ronnett BM. Morphology and DNA content analysis in the evaluation of first trimester placentas for partial hydatidiform mole

(PHM). *Hum Pathol* 2000; 31: 914-24.

199. Matsuzaki N, Taniguchi T, Shymoya K i sur. Placental interleukin-6 production is enhanced in intrauterine infection but not in labor. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168: 94-7.

200. Nuovo GJ, Cooper LD, Bartholomew D. Histologic, infectious, and molecular correlates of idiopathic spontaneous abortion and perinatal mortality. *Diagn Mol Pathol* 2005; 14: 152-8.

201. Ornoy A, Dudai M, Sadovsky E. Placental and fetal pathology in infectious mononucleosis. A possible indicator for Epstein-Barr virus teratogenicity. *Diagn Gynecol Obstet* 1982, 4: 11-6.

202. Qumsiyeh MB, Kim KR, Ahmed MN, Bradford W. Cytogenetics and mechanisms of spontaneous abortions: increased apoptosis and decreased cell proliferation in chromosomally abnormal villi. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 88: 230-5.

203. Sharma S, Murphy SP, Barnea ER. Genes regulating implantation and fetal development: a focus on mouse knockout models. *Front Biosci* 2006; 11: 2123-37.

204. Fontana V, Choren V, Vauthay L, Calvo JC, Calvo L, Cameo M. Exogenous interferon-gamma alters murine inner cell mass and trophoblast development. Effect on the expression of ErbB1, ErbB4 and heparan sulfate proteoglycan (perlecan) *Reproduction* 2004; 128: 717-25.

205. Hermonat PL, Han L, Wendel PJ i sur. Human papillomavirus is more prevalent in first trimester spontaneously aborted products of conception compared to elective specimens. *Virus Genes* 1997; 14: 13-7.

206. Panday MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet* 2005; 272: 95-108.

207. Costeas PA, Koumouli A, Giantsiou-Kyriakou A, Papaloizou A, Koumas L. Th2/Th3

- cytokine genotypes are associated with pregnancy loss. *Hum Immunol* 2004; 65: 135-41.
208. Taylor DD, Bohler CH, Gercel-Taylor C. Pregnancy-linked suppression of TcR signaling pathways by a circulating factor absent in recurrent spontaneous pregnancy loss (RPL). *Mol Immunol* 2006; 43: 1872-80.
209. Yamada H, Morikawa M, Furuta I i sur. Intravenous immunoglobulin treatment in women with recurrent abortions: increased cytokine levels and reduced Th1/Th2 lymphocyte ratio in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49: 84-9.
210. Amani D, Zolghadri J, Dehaghani AS, Pezeshki AM, Ghaderi A. The promoter region (-800, -509) polymorphisms of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) gene and recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* 2004; 62: 159-66.
211. Wang X, Thomas P, Xue J, Fenech M. Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro-evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21. *Mutat Res* 2004; 551: 167-80.
212. Bezold G, Politch JA, Kiviat NB, Kuypers JM, Wolff H, Anderson DJ. Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. *Fertil Steril* 2007; 87:1087-97.
213. Aziz N, Agarwal A. Evaluation of sperm damage: beyond the World Health Organization criteria. *Fertil Steril*. 2007 Oct 20; u tisku
214. Beers MH i Berlow R. The Merck manual of diagnosis and therapy. Merck research laboratories, division of Merck & Co. Inc. White house station, N.J. 1999, str. 62.

11. ŽIVOTOPIS

Zaposlenje: KBC Split, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu Klinika za dječje bolesti
Klinički odjel dječje hematologije, onkologije, imunologije i medicinske genetike

Voditeljica: Odsjeka za medicinsku genetiku s laboratorijem za humanu genetiku i genetskim savjetovalištem. Voditeljica laboratorija za humanu genetiku.

Školovanje: Osmogodišnja škola i klasična gimnazija u Splitu; 1970.-1976. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 1976.-1981. liječnik: Dom zdravlja “Dr Petar Vitezica”- Split.

Specijalizacija: 1981.-1986. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Klinika za dječje bolesti KBC Zagreb i Klinika za dječje bolesti KBC Split.

Poslijediplomski studiji: 1984.-1985. Klinička pedijatrija, KBC Zagreb,

1986.-1987. Medicinska genetika, KBC Zagreb, Klinika za dječje bolesti, Zavod za medicinsku genetiku: prof. dr. sc. Ljiljana Zergllern Čupak

1989. Inter University Center of postgraduate studies Dubrovnik: Recent Advances in Human Genetics, Dubrovnik: prof. dr. sc. Ljiljana Zergollern Čupak.

1990. Inter University Center of postgraduate studies Dubrovnik: Summer School of Prenatal Medicine: prof. dr. sc. Nina Canki-Klain. Cours 1: Clinical Biology of the Fetus, Dubrovnik.

Edukacija u drugim institucijama u zemlji i inozemstvu:

1. KBC Zagreb, Klinika za dječje bolesti, Zavod za medicinsku genetiku, 1987. prof. dr. sc. Ljiljana Zergollern Čupak, profesor emeritus Sveučilišta u Zagrebu

2. Centro di ricerca “M. Tettamanti” Leucemie ed emopatie infantili, prof. dr. sc. Andrea

Biondi, Ospedale San Gerardo, Università di Milano Clinica Pediatrica, Univ. Professore Giuseppe Masera, Ematologia, 1991 u trajanju od 3 mjeseca, a do 1998.g. 7-15 dana godišnje.

1994. obrana magistarskog rada: Medicinski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu: “Praćenje djece s kongenitalnim anomalijama i analiza njihovih obitelji na području Splita”. Mentor: prof. dr. sc. Livio Balarin, Split

2003. prijava doktorske disertacije

2005. naslov primarius

2007. subspecijalist medicinske genetike

24. veljače 2007. Zahvalnica Zbora liječnika Hrvatske

Stručne organizacije:

1976. Zbor liječnika hrvatske, 1986. Hrvatsko pedijatrijsko društvo

1987. Hrvatsko društvo za humanu genetiku (HDHG) član upravnog odbora, predsjednik splitskog ogranka.

1995. Hrvatsko društvo hemato-onkologa i transfuziologa

1996. European Society of Human Genetics (ESHG)

1997. European Society of Cytogenetics (ECA)

2000. International Society of Pediatric Oncology (SIOP) i Histocyte Society (1994)

Osnivač i član upravnog odbora 5 dobrotvornih udruga. Govori engleski, francuski i talijanski jezik. Tijekom stručnog rada uvela je genetsko savjetovište tumorsku i prenatalnu citogenetiku. Organizirala nekoliko stručnih skupova za istaknuti je: Prvi hrvatski simpozij o sindromu Down s međunarodnim sudjelovanjem u Splitu 2004.g.

Predavač na poslijediplomskom tečaju I kategorije: Genetski savjet u citogenetici. Praktični aspekti genetskog savjetovanja. Hrvatski institut za istraživanje mozga, Zagreb, srpnja 2007.

Objavila 26 rada, od toga 13 koji se citiraju u CC i jedno poglavlje u knjizi. Objavila 97 sažetka, a 42 ih se citira u CC časopisima.

Nastava: Od 1991. god u nastavi Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu te stručnim studijima sestrinstva i radiologije za kolegij pedijatrije (suradničko zvanje naslovni asistent od 1998)

Znanstveni projekti:

1. Genetsko i epidemiološko istraživanje mišićnih distrofija u Hrvatskoj. Prof. dr. sc. Nina Canki-Klain, Zagreb, 1998.
2. Genetska studija šećerna bolest tip 1 u populaciji Dalmacije. Prof. dr. sc. Tatjana Zemunik, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
3. Gensko liječenje tumora djelovanjem na molekule imunološkog sustava. Prof. dr. sc. Jasminka Pavelić, Institut “ Ruđer Bošković” Zagreb, 2006.
4. Telomere i kromosomske aberacije u patologiji dječje dobi. Prof. dr. sc. Iskra Petković, Klinika za dječje bolesti Zagreb, 2007.

Mentor na diplomskom radu:

1. Majana Engelbreht, 2001. Fakultet prirodoslovno-matematičkih znanosti i odgojnih područja, Split: Učestalost konstitucijskih polimorfizama na kromosomima #1, #9, #16 u neplodnih partnera.
2. Jelena Šutić, 2003. Fakultet prirodoslovno-matematičkih znanosti i odgojnih područja, Split Učestalost i važnost polimorfizma heterokromatina na kromosomu #9 kod različitih sindroma.:
3. Sonja Iskić, 2005. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, stručni studij sestrinstva: Downov sindrom.