

# Imunohistokemijska razina IGF1R-a, VEGF-a, Fas-a i Fas liganda u posteljicama iz trudnoća kompliciranih idiopatskim intrauterinim zastojem rasta ploda i intrauterinim zastojem rasta ploda udruženim s preeklampsijom

---

Rešić Karara, Jasminka

Doctoral thesis / Disertacija

2019

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:341924>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**JASMINKA REŠIĆ KARARA**

**IMUNOHISTOKEMIJSKA RAZINA IGF1R-A, VEGF-A,  
FAS-A I FAS LIGANDA U POSTELJICAMA IZ TRUDNOĆA  
KOMPLICIRANIH IDIOPATSKIM INTRAUTERINIM  
ZASTOJEM RASTA PLODA I INTRAUTERINIM ZASTOJEM  
RASTA PLODA UDRUŽENIM S PREEKLAMPSIJOM**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2019.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**JASMINKA REŠIĆ KARARA**

**IMUNOHISTOKEMIJSKA RAZINA IGF1R-A, VEGF-A,  
FAS-A I FAS LIGANDA U POSTELJICAMA IZ TRUDNOĆA  
KOMPLICIRANIH IDIOPATSKIM INTRAUTERINIM  
ZASTOJEM RASTA PLODA I INTRAUTERINIM ZASTOJEM  
RASTA PLODA UDRUŽENIM S PREEKLAMPSIJOM**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2019.**

Rad je izrađen u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split.

Mentorica: prof. dr. sc. Ivana Kuzmić Prusac

## ZAHVALE

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ivani Kuzmić Prusac i dr. sc. Sandri Zekić Tomaš na nesebičnoj pomoći prilikom izrade moje disertacije. Raditi s vama i biti dio vašeg tima bilo je izuzetno zadovoljstvo.

Hvala prof. dr. sc. Damiru Roji koji je uvijek bio spreman za razgovor i davao mi savjete.

Hvala mom suprugu i sinu koji su najzaslužniji što ova disertacija uopće postoji. Ponekad su me vjerojatno mrzili, patili zajedno sa mnom, žalili za vremenom koje nismo proveli zajedno, ali ipak su bili uvijek uz mene. Bili su moja najveća potpora.

Još jednom velika hvala mojim roditeljima! Bez njih sve bi ovo bio samo san.

Ovu disertaciju posvećujem svojim roditeljima.

"Velika je tragedija znanosti - ubijanje prekrasne pretpostavke zbog ružne činjenice."

T. H. Huxley

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	3
1.1 Posteljica.....	3
1.1.1 Građa posteljice.....	3
1.1.2 Razvoj posteljice .....	5
1.1.3 Pretvorba spiralnih arterija .....	7
1.2 Intrauterini zastoj rasta .....	8
1.2.1 Definicija i klasifikacija .....	8
1.2.2 Etiopatogeneza .....	8
1.2.3 Dijagnoza i prenatalni postupak.....	9
1.2.4 Klinička specifičnost i značaj.....	11
1.3 Preeklampsija.....	12
1.3.1 Definicija i klasifikacija .....	12
1.3.2 Etiopatogeneza .....	13
1.4 Receptor inzulinu sličnog čimbenika rasta.....	14
1.5 Vaskularni endotelni čimbenik rasta .....	15
1.6 Sustav Fas/FasL.....	16
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE .....	18
3. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA.....	20
3.1 Materijal.....	20
3.2 Metode istraživanja.....	22
3.2.1 Obrada i patohistološka analiza tkiva.....	22
3.2.2 Imunohistokemijsko bojenje .....	22
3.2.3 Statistički postupci .....	24
4. REZULTATI.....	26
4.1 Demografska obilježja skupina.....	26
4.2 Imunohistokemijska razina IGF1R-a u DC-ma, VTB-u, EVTB-u, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama <i>decidue basalis</i> ispitivanih posteljica.....	27
4.3 Imunohistokemijska razina VEGF-a u DC-ma, VTB-u, EVTB-u, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama <i>decidue basalis</i> ispitivanih posteljica.....	31
4.4 Imunohistokemijska razina Fas-a u DC-ma, VTB-u, EVTB-u, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama <i>decidue basalis</i> ispitivanih posteljica.....	34
4.5 Imunohistokemijska razina FasL-a u DC-ma, VTB-u, EVTB-u, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama <i>decidue basalis</i> ispitivanih posteljica.....	35

4.6	Povezanost imunohistokemijske razine IGF1R-a s FasL-om u DC-ma, VTB-u, EVTB-u, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama <i>decidue basalis</i> u ispitivanim posteljicama .....	39
4.7	Broj resica, broj krvnih žila posteljičnih resica te omjer broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica u ispitivanim posteljicama .....	39
4.8	Povezanost broja omjera broja krvnih žila posteljičnih resica i broj resica u ispitivanim dijelovima posteljicama kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE -om i urednih trudnoća s IGF1R-om i VEGF-om .....	40
5.	RASPRAVA .....	42
6.	ZAKLJUČAK .....	49
7.	SAŽETAK .....	50
8.	SUMMARY .....	52
9.	LITERATURA .....	54
10.	ŽIVOTOPIS .....	63

## **POKRATE**

AC – opseg trbuha (engl. *Abdominal Circumference*)

ACOG – Američko udruženje ginekologa i opstetričara ( engl. *The American Congress of Obstetricians and Gynecologists*)

AFI – volumen plodove vode (engl. *Amniotic Fluid Index*)

BPD – biparijetalni promjer (engl. *Biparietal Diameter*)

BFP – fetalni biofizički profil

CTB – citotrofoblast (engl. *Cytotrophoblast*)

DC – decidualna stanica (engl. *Decidual Cell*)

DEC – *decidua basalis* (lat.)

EFW – procjenjena masa ploda (engl. *Estimated Fetal Weight*)

EVTB – izvanresični trofoblast (engl. *Extravillous Trophoblast*)

FL – dužina bedrene kosti (engl. *Femur Length*)

GVHD – bolest presatka protiv primatelja (engl. *Graft Versus Host Disease*)

HC – opseg glave (engl. *Head Circumference*)

HIF – hipoksijom induciran čimbenik (engl. *Hypoxic Inducible Factor* )

IGFBP 1-6 – Proteini 1-6 koji vezuju inzulinu sličan čimbenik rasta (engl. *Insuline Like Growth Factor Binding Proteins 1-6*)

IGF– inzulinu sličan čimbenik rasta (engl. *Insuline Like Growth Factor*)

IGF I – inzulinu sličan čimbenik rasta I (engl. *Insuline Like Growth Factor I*)

IGF II – inzulinu sličan čimbenik rasta II (engl. *Insuline Like Growth Factor II*)

IGF1R– receptor inzulinu sličanog čimbenika rasta 1 (engl. *Insulin Growth Factor Receptor I*)



IGF2R – receptor inzulinu sličanog čimbenika rasta 2 (engl. *Insulin Growth Factor Receptor 2*)

IUZR – intrauterini zastoj rasta

I-IUZR – idiopatski intrauterini zastoj rasta

IUZR + PE – intrauterini zastoj rasta + preeklampsija

KŽ – krvne žile posteljinih resica

KŽDEC – krvne žile *decidue basalis*

MMPs – matriks metaloproteinaza (engl. *Matrix Metalloproteinase*)

NKC – prirodna stanica ubojica (engl. *Natural Killer Cell*)

NO – dušikov oksid (engl. *Nitrous Oxide*)

PE – preeklampsija (engl. *Preeclampsia*)

PCR – polimerazna lančana reakcija (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

PGF – posteljni čimbenik rasta (engl. *Placental Growth Factor*)

RI – indeks otpora (engl. *Resistance Index*)

ROS – slobodni kisikovi radikali (engl. *Reactive Oxygen Radicals*)

SČ – sincicijski čvorić

SGA – malen za dob trudnoće (engl. *Small for Gestational Age*)

STB – sinciotrofoblast (engl. *Syncytiotrophoblast*)

SŽS – središnji živčani sustav

TB – trofoblast (engl. *Trophoblast*)

TNF – tumor nekrotizirajući čimbenik (engl. *Tumor Necrosis Factor*)

VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VTB – resični trofoblast (engl. *Villous Trophoblast*)

# 1. UVOD

## 1.1 Posteljica

### 1.1.1 Građa posteljice

Posteljica je organ specifičan za trudnoću, a povezuje dva genetski i imunološki različita organizma: majku i fetus. Jedini je privremeni organ u čovjeka koji se po završenoj funkciji jednostavno odbacuje. Veliki broj različitih funkcija posteljice dijeli se u četiri osnovne skupine: metaboličku, respiratornu, endokrinološku i imunološku (1).

Definirana posteljica ima dvije strane: fetalnu i majčinu (Slike 1a i 1b).



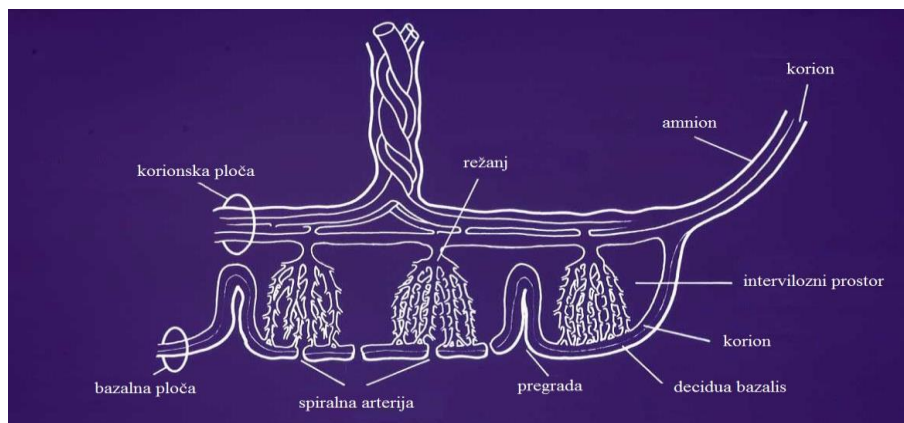
Slika 1a. Makroskopski prikaz majčine strane termenske posteljice iz uredne trudnoće



Slika 1b. Makroskopski prikaz fetalne strane termenske posteljice iz uredne trudnoće

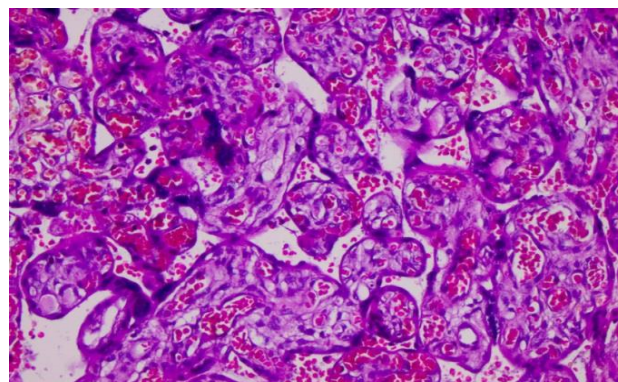
Fetalnu stranu predstavlja korionska, a majčinu bazalna ploča. Od korionske ploče se prema bazalnoj širi trofoblasno stablo kojeg čini sustav resica i njihovih ogranaka koje prati grananje fetalnih krvnih žila. Zrela termenska posteljica ima oko 10-16 generacija matičnih resica,

mezenhimske resice, zrele intermedijarne i terminalne resice. Terminalne resice su krajnji ogranci, sadržavaju fetalnu kapilaru kao nastavak arterijskog grananja fetalnih pupčanih arterija. Predstavljaju temeljnu funkcionalnu jedinicu posteljice. Majčina strana ili bazalna ploča podijeljena je na 10-40 režnjeva koji se nazivaju kotiledoni, međusobno su odvojeni pregradama. Na njoj se površini otvaraju spiralne arterije i započinju spiralne vene. Majčina krv između spiralnih arterija i vena ne prolazi kapilarni bazen, već se širi oko resica trofoblasta (TB), kroz tzv. intervilozni prostor (Slika 2). Svaki kotiledon posteljice sadržava najmanje jedno resično stablo koje oplahuje krv iz pripadajuće spiralne arterije.



Slika 2. Shematski prikaz građe posteljice

Histološka građa korionske ploče objedinjuje: stanice amniona i koriona, ogranke krvnih žila pupkovine i matične resice. Bazalnu ploču sačinjavaju stanice bazalnog sloja decidualno promijenjenog endometrija (lat. *decidua basalis*), stanice izvanresičnog trofoblasta (engl. *Extravillous Trophoblast* - EVTB) i ogranci spiralnih arterija majke. Analiza posteljice radi se u središnjim dijelovima posteljične ploče, gdje se najbolje vidi razgranatost i vaskularizacija posteljičnih resica (Slika 3).



Slika 3. Mikroskopski prikaz posteljičnih resica termenske posteljice iz uredne trudnoće (HE x 200)

### 1.1.2 Razvoj posteljice

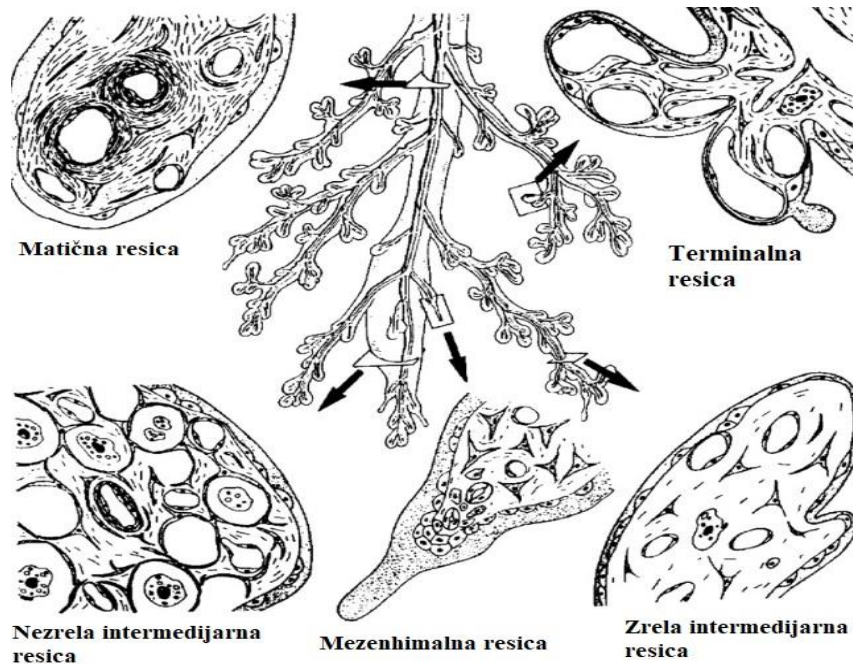
Proces nastanka posteljice naziva se placentogeneza, dok placentacija podrazumijeva uspostavu dvaju paralelnih krvotoka: fetalnog i majčinog. Rast i razvoj posteljice reguliran je lokalnom sekrecijom i međudjelovanjem brojnih hormona rasta, adhezijskih molekula, proteina izvanstaničnog matriksa, hormona i transkripcijskih čimbenika koji djeluju parakrinim i autokrinim mehanizmima (1,2). Konačnom izgledu posteljice prethodi razvojni put koji započinje prvom diferencijacijom stanica embrija šest dana nakon oplodnje. Prva tri dana zametak putuje kroz jajovod u obliku morule, sa svim stanicama identične građe i u ukupnom volumenu zigote. Pucanjem polisaharidnog omotača (lat. *zona pellucida*) započinje prva diferencijacija i to u dva smjera: iz embrioblasta se dalje razvija embrio, a iz TB-a plodovi ovoji i fetalna strana posteljice. Rezultat je blastocista koja se, koristeći pinopodije i adhezijske molekule, prislanja (proces adhezije i apozicije) na decidualno promijenjenu sluznicu maternice. Slijedi izrazito bujanje stanica TB-a i formiranje stabla resica. Većina resica ostaje slobodna u interviloznom prostoru (lat. *villi liberi*), a manji se dio vezuje za bazalnu ploču tzv. sidrene resice (lat. *villi fixativi*). Tek se mali dio TB-a razvija kao „ne-resični“ ili EVTB. Prodiranjem u područje bazalne ploče EVTB osigurava kvalitetne temelje sidrenim resicama, transformaciju sluznice maternice u interakciji s fetalnim tkivom, modulira lučenje tumor nekrotizirajućeg čimbenika alfa (engl. *Tumor Necrosis Factor Alpha - TNF-α*) iz makrofaga endometrija i sudjeluje u fiziološkoj transformaciji spiralnih arterija poticanjem apoptoze u mišićnim i endotelnim stanicama krvne žile. Zreli TB u posteljici predstavlja epitelni pokrov terminalnih i svih drugih resica. Sastoji se od dva sloja. Na bazalnoj membrani resica leži jednostanični citotrofoblast (CTB), iznad kojeg se prostire multinuklearni sloj citoplazme poznat kao sinciotrofoblast (STB). U interviloznom prostoru STB je u direktnom kontaktu s majčinom krvi. Nakon diobe stanica CTB-a dio ostaje na mjestu kao depo matičnih stanica, dok se ostatak diferencira u dva smjera: STB i EVTB (2,3). Fuzijom stanica CTB-a nastaje multinuklearni sloj stanica STB-a koji raste prema decidualnoj ploči. Apoptoza je neophodna za fuziju stanica CTB-a i formiranje STB-a (3,4). Pojačan izražaj antiapoptotskih čimbenika naprama ostalim tkivima usporava proces apoptoze u TB-u (4). Jezgre stanica CTB-a ulaskom u STB gube mogućnost daljnje diobe, ali zadržavaju metaboličku aktivnost koja slabi s progresijom apoptoze. Apoptozom usmrćene jezgre s pripadajućom citoplazmom u obliku apoptotskih tjelešaca, tzv. sincicijski čvorići (SČ) otpuštaju se od STB-a mehanizmom sličnim egzocitozi, čime završava životni ciklus TB-a

koji traje oko 25 dana (4). Apoptotska tjelešca sasvim su imunološki inertna i u fiziološkim uvjetima u normalnim trudnoćama ne uzrokuju upalnu reakciju majke (5).

Kada STB dosegne decidualnu ploču unutar njega nastaju šupljine (lakune). Ostatni dio stanica STB-a koji spaja korionsku ploču s bazalnom pločom naziva se trabekula. Nastankom lakuna u STB-u koje su međusobno odvojene trabekulama započinje lakunarno razdoblje u razvoju posteljice, a traje od 8. do 13. postkonceptijskog dana. Uraštanjem CTB-a u trabekule nastaju primarne resice: trabekule tada postaju sidrene resice, a lakune intervilozni prostori (2). Od 15. do 20. postkonceptijskog dana slijedi invadiranje stanica ekstraembrionalnog mezoderma i hemangioblasta u trabekule čime nastaju sekundarne resice (6). Nastankom prvih fetalnih krvnih žila iz hemangioblasta u procesu vaskulogeneze (stvaranje fetalnih krvnih žila *de novo* koje traje do kraja trećeg postkonceptijskog tjedna) sekundarne resice postaju tercijarne (7). Sve ostale resice su podrazredi tercijarnih resica, a to su: mezenhimske, matične, nezrele intermedijarne, zrele intermedijarne i terminalne resice (Slika 4) (6). Stvaranjem podrazreda tercijarnih resica na proces vaskulogeneze nastavlja se proces angiogeneze (stvaranje krvnih žila iz već postojećih krvnih žila) (6-8).

Tercijarne resice postaju mezenhimske stvaranjem kapilarne mreže u stromi. Mezenhimska resica se pretvara u nezrelu intermedijarnu (do 23. tjedna gestacije) ili u zrelu intermedijarnu resicu (nakon 23. tjedna gestacije). Do početka 23. postkonceptijskog tjedna sve mezenhimske resice se diferenciraju u nezrele intermedijarne resice, a one kasnije prelaze u matične. Osnovna funkcija matičnih resica je da služe kao skelet koji podržava periferne ogranke stabla korionskih resica (8). Opisano se naziva faza granajuće angiogeneze (9). Od 23. tjedna, a najizraženije od 24. do 26. postkonceptijskog tjedna, u posteljici nastaju promjene smjera diferencijacije mezenhimskih resica prema zrelim intermedijarnim resicama. Za razliku od nezrelih intermedijarnih resica zrele intermedijarne resice ne prelaze u matične resice (8). Tada prevladava proces ngranajuće angiogeneze koji traje do termina (9). Zrele intermedijarne resice prelaze u terminalne resice. Terminalne resice karakterizira visoki stupanj kapilarizacije te izrazito dilatirane sinusoidne. Vaskulosincicijske membrane su područja na terminalnim resicama koje su od interviloznog prostora u kojem kola majčina krv odvojene TB-om, bazalnom membranom TB-a, endotelom kapilara i bazalnom membranom endotela kapilara, čime se maksimalno smanjuje difuzijska udaljenost između majke i fetusa. Stoga su vaskulosincicijske membrane najefikasnije strukture za razmjenu tvari između majke i ploda (8). Terminalne resice su najobilnije resice u posteljicama terminske trudnoće. Angiogeneza i vaskulogeneza su sastavni dio gore opisanog razvoja posteljčnih resica. Oba procesa su pod usklađenim djelovanjem angiogenih i antiangiogenih čimbenika. Brojni su

čimbenici od kojih su najbitniji vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF), kojeg uglavnom sintetizira CTB, posteljični čimbenik rasta (engl. *Placental Growth Factor* - PGF) i njihovi receptori te parcijalni tlak O<sub>2</sub> (6,7,9).



Slika 4. Pojednostavljeni prikaz perifernog dijela zrelog posteljičnog stabla resica te tipičan presjek raznih tipova resica. Dostupno na <http://fn.bmj.com/content/77/3/F171> [pristupljeno 29. svibnja 2018]

Pravilan rast, sazrijevanje i grananje resica osnovni je mehanizam koji omogućava posteljici praćenje sve većih zahtjeva ploda.

### 1.1.3 Pretvorba spiralnih arterija

Funkcija EVTB-a koji aktivno urasta u deciduu je pretvorba spiralnih arterija maternice u uteroplacentne krvne žile (10). Pretvorba spiralnih arterija odvija se u dvije faze: prva započinje samom implantacijom, a druga nakon 12. tjedna trudnoće i završava u 18. tjednu trudnoće. Prvi val mijenja spiralne arterije, a drugi krajnju trećinu radijalnih arterija. Radijalne arterije su dio miometrija, čime se zamišljena granica invazije pomiče dublje u stijenku maternice. Endotel i glatko mišićni sloj majčine krvne žile u transformiranom dijelu zamijeni EVTB i time postaje sastavni dio majčine krvne žile. U tom procesu majčine krvne žile gube mišićnu stijenku i time prestaju biti osjetljive na kateholamine, ljevkaasto se šire čime se struja

krvi naglo usporava i štiti resice od oštećenja. Iako pretvorba spiralnih arterija završava sredinom trudnoće, angiogeneza u posteljici i u fetusu traje tijekom čitave trudnoće (11).

## **1.2 Intrauterini zastoj rasta**

### **1.2.1 Definicija i klasifikacija**

Intrauterini zastoj rasta (IUZR) je klinički sindrom koji se očituje smanjenim fetalnim rastom ili nemogućnošću fetusa da dosegne njegov genetski potencijal za rast (12). Klinička dijagnoza IUZR-a postavlja se kada je izmjerena masa fetusa ili novorođenčeta ispod 10. percentila za dob trudnoće naprama standardnim vrijednostima u populaciji s korekcijom za paritet i spol fetusa ili novorođenčeta (13). Fetalni rast se odvija u tri faze: hiperplastična faza rasta u prvom tromjesečju trudnoće; hiperplastični i hipertrofični rast u drugom tromjesečju, nakon čega u trećem tromjesečju trudnoće slijedi samo hipertrofična faza fetalnog rasta (12). Temeljem toga IUZR dijelimo na tri tipa. Tip I ili simetrični IUZR-a zahvaća 20-30% ukupnog broja IUZR-a. Novorođena djeca su premalena za gestacijsku dob, ali proporcionalnog izgleda. Tip II ili asimetrični IUZR zahvaća 70-80% svih IUZR-a, a novorođena djeca su neproporcionalnog izgleda, rođena s malenom porođajnom masom i razmjerno većom glavom. Tip III se smatra kombiniranim (intermedijarnim) tipom kada štetan čimbenik specifičan za tip II počne djelovati prije i utječe na hipertrofičnu i hiperplastičnu fazu rasta (14). Novorođena djeca su smanjene porođajne mase i dužine.

### **1.2.2 Etiopatogeneza**

Incidencija IUZR-a je od 5-7% (15). Priroda samog procesa i vrijeme nastanka IUZR-a utječu na klinički tijek i perinatalnu prognozu (16). Nastanak IUZR-a je posljedica umanjenog potencijala za rast i/ili umanjene potpore za rast ploda. Potencijal za rast ploda određuju genetski i okolišni čimbenici, dok potporu za rast određuje posteljica. Jedan od najznačajnijih regulatora fetalnog rasta je inzulinu sličan čimbenik rasta (engl. *Insulin Like Growth Factor* - IGF). On zajedno s ostalim čimbenicima rasta i angiogenim čimbenicima omogućava djelujući parakrino, autokrino i endokrino, pravilan rast i razvoj posteljice i remodelaciju spiralnih arterija (12,16).

Oštećeno dijeljenje embrionalnih stanica u ranoj trudnoći, čija je etiologija raznolika, a najčešće uključuje kromosomopatije, kongenitalne anomalije, određene lijekove, infekcije



itd., uzrokuje nastanak tipa I zastoja rasta. Neadekvatna placentacija osnova je za razvoj tipa II i III IUZR-a. Različiti etiološki čimbenici su uzrok neadekvatne placentacije: preegzistirajuće bolesti majke (npr. sistemske bolesti, antifosfolipidni sindrom) ili nastaje *de novo* bez pridružene bolesti majke. U asimetričnom IUZR-u poremećen je proces hipertrofije, a ponekad i hiperplazije stanica (14,16). Kada se IUZR očituje bez drugih poremećaja trudnoće naziva se idiopatski (I-IUZR). Intrauterini zastoj rasta može biti pridružen nekim drugim bolestima trudnoće, najčešće preeklampsiji (PE).

Preeklampsija povećava rizik za nastanak IUZR-a. Istraživanja pokazuju da će 12,8-58,6% trudnoća s ranom PE-om biti udruženo s IUZR-om, dok će njih 15% s IUZR-a imati superponiranu PE u trudnoći (17,18). S obzirom na to da su brojni čimbenici rizika zajednički IUZR-u i PE-i, još nije u potpunosti poznato zašto se neki očituju samo IUZR-om, intrauterinim zastojem rasta udruženim s preeklampsijom (IUZR+PE), a neki samo PE-om. Sindromi PE-a i IUZR-a preklapaju se u situacijama moguće ili vjerojatne etiopatogeneze. Tada je IUZR češće asimetrični ili simetrično-asimetrični i posljedica nedovoljne potpore, a PE je rezultat istog stanja koje rezultira otpuštanjem viabilnog TB-a u cirkulaciju majke (18).

### 1.2.3 Dijagnoza i prenatalni postupak

Klinička dijagnoza IUZR-a može se postaviti u prenatalnom razdoblju uz pomoć metoda klasičnog porodništva i UZV metode. U metode klasičnog porodništva spadaju: mjerenje visine fundusa, palpacija Leopold-Pavlikovim hvatovima i mjerenje visine fundus-simfiza u cm (14,19).

Ultrazvučna metoda započinje biometrijom fetusa u što spadaju: biparijetalni promjer (engl. *Biparietal Diameter* – BPD) uz koji se u slučaju dolichocefalije i brachicefalije mjeri opseg glave (engl. *Head Circumference* – HC), opseg trbuha (engl. *Abdominal Circumference* – AC) koji u drugom tromjesečju služi za procjenu dobi trudnoće, a u trećem tromjesečju za procjenu uhranjenosti te duljina bedrene kosti (engl. *Femur Length* - FL ).

Uvrštavanjem gore navedenih biometrijskih mjerenja zasebno ili zajedno u matematičke formule procjenjujemo masu ploda (engl. *Estimated Fetal Weight* - EFW). U kliničkoj praksi najviše se koristi formula po Hadlocku [ $\text{Log}_{10} \text{BW} = 1.335 - 0.000034 (\text{AC} \times \text{FL}) + 0.00316 (\text{BPD}) + 0.00457 (\text{AC}) + 0.01623 (\text{FL}^9)$ ]. Srednja vrijednost apsolutne pogreške u procjeni mase ploda korištenjem ove formule bila je 10-11% (20). Vrijednost apsolutne pogreške u izračunu EFW-a raste s porastom mase fetusa > 4000g i smanjenjem mase fetusa < 2500g.



Točnost procjene smanjuje se i u slučajevima oligohidramnija, smještaju posteljice sprijeda, pretilosti majke. Procjena EFW-a ispod 10. percentila za dob trudnoće korigirana za spol i paritet svrstava plod u IUZR ili u literaturi još poznat kao malen za gestacijsku dob (engl. *Small For Gestational Age* - SGA) što potvrđujemo nakon najmanje dva mjerenja u razmaku od dva tjedna (14). Kada su svi biometrijski pokazatelji niži u odnosu na gestacijsku dob govorimo o simetričnom IUZR-u. Dijagnozu asimetričnog IUZR-a postavljamo kada je AC manji u odnosu na gestacijsku dob, a BPD, HC i FL su uredne veličine. Kombinirani IUZR dijagnosticiramo u fetusa kod kojih su BPD, HC i FL manji za gestacijsku dob, a AC manji od njih (12,20,21).

U procjeni ugroženosti fetusa s IUZR-om pomažu nam dole navedene dodatne metode.

Fetalni biotjelesni profil (BFP) se sastoji od pet biofizikalnih aktivnosti koji se dijele na akutne i kronične biljege fetalne ugroženosti. Akutni biljezi fetalne ugroženosti su fetalni tonus, fetalni pokreti, fetalni respiracijski pokreti i kardiotokografski zapis dok je indeks plodove vode kronični biljeg fetalne ugroženosti. Fetalni tonus podrazumijeva otvaranje i zatvaranje šake ili barem jednu aktivnu ekstenziju ili fleksiju udova. Fetalni pokreti uključuju barem tri pokreta tijela ili udova u trideset minuta. Fetalni respiracijski pokreti koji su prisutni najmanje trideset sekundi u razdoblju od trideset minuta. Kardiotokografski zapis (CTG) mjeri promjenu srčane frekvencije u jedinici vremena i istovremeno bilježi kontrakcije maternice. CTG zapis prikazuje osnovnu, oscilacije osnovne i promjenu osnovne fetalne srčane frekvencije. Prisutnost dvije akceleracije veće od petnaest i više otkucaja u trajanju od petnaest sekundi nakon micanja fetusa kroz trideset minuta uz urednu bazalnu frekvenciju smatra se urednim CTG zapisom. Indeks plodove vode (engl. *Amniotic Fluid Index* - AFI) je ultrazvučna mjera količine plodove vode. Normalan raspon AFI je od 5-25; kada je AFI<5 postavlja se dijagnoza oligohidramnija te nas ista indirektno upućuje na oštećenu funkciju posteljice ili određene malformacije fetusa od čega su najčešće one urinarnog sustava. Svaka sastavnica BFP ako je uredna nosi dva boda, a ako nije nula. Zbroj bodova čini ocjenu BFP koja je indirektni pokazatelj fetalne kondicije te predviđa perinatalni ishod i pomaže u odlučivanju dovršetka trudnoće.

Doplerska ultrazvučna metoda nam omogućava procjenu hemodinamskih promjena fetalnog i uteroplacentarnog krvotoka. U kliničkoj praksi najčešće mjerimo protok krvi u srednjoj moždanoj arteriji (*a. cerebri media*) i pupčanoj arteriji (*lat. a.umbilicalis*). Pri analizi arterijskog dopler signala najčešće se koristimo Pourcelotovim indeksom otpora (engl. *Resistance Index* - RI), indeksom pulsatilnosti (engl. *Pulsatility Index* - PI) i omjerom sistole i dijastole. Sva tri mjerenja na različite načine uspoređuju najvišu brzinu strujanja krvi u sistoli

i najnižu u dijastoli. Indeks otpora središnje moždane arterije je proporcionalan parcijalnom tlaku O<sub>2</sub> fetalne krvi. Dopler pupčane arterije pokazuje smanjenje indeksa otpora na račun porasta dijastole napredovanjem trudnoće. Povećani otpor u krvnim žilama posteljice trudnoća kompliciranih IUZR-om za posljedicu ima povećanje indeksa otpora pupčane arterije na račun smanjenja dijastole ili potpuni izostanak dijastole ili obrnuti protok u dijastoli. Najprecizniji pokazatelj hemodinamskih promjena u posteljici i mozgu, a neovisan o srčanoj frekvenciji je cerebroumbilikalni omjer (omjer indeksa otpora srednje moždane arterije i umbilikalne arterije). U urednim trudnoćama on je uvijek veći od 1. Pad cerebroumbilikalnog omjera ispod 1 je posljedica smanjenja indeksa otpora srednje moždane arterije. Vazodilatacija krvnih žila mozga koja nastaje zbog centralizacije fetalnog krvotoka je uzrok smanjenog indeksa otpora u srednjoj moždanoj arteriji.

Amnioskopija je metoda kojom se promatra izgled plodove vode da bi se procijenila fetalna zrelost i njegova potencijalna ugroženost. Vibroakustična stimulacija fetusa koristi se za izazivanje refleksa trzaja koji uzrokuje fetalne pokrete koji za posljedicu imaju akceleracije u fetalnoj srčanoj frekvenciji i znak su dobre kondicije fetusa. Majčino praćenje pokreta djeteta također je jedan od bitnih pokazatelja djetetova stanja. Niti jedna od ovih metoda sama za sebe nije dovoljno dobra u procjeni ugroženosti fetusa, ali u kombinaciji pomažu kliničaru, nakon što je prepoznao fetus s IUZR-om, donijeti kliničku odluku je li riječ samo o SGA ili IUZR-u kojem je potrebna intervencija i pojačan klinički nadzor (20-22).

Za razliku od fetusa s IUZR-om, SGA fetusi dostižu svoj genetski potencijal i imaju uredan nalaz BFP-a. Danas se preporučava napraviti individualni graf rasta za svaki fetus, zato jer je loš perinatalni ishod rijedak u SGA fetusa, dok su fetusi ispod i blizu 10. percentila, koji ne dostignu svoj genetski potencijal (IUZR) skloni lošijem perinatalnom ishodu (14,15,17,19).

#### 1.2.4 Klinička specifičnost i značaj

Intrauterini zastoj rasta ima neujednačenu i ponekad nepoznatu etiopatogenezu zbog čega ga i svrstavamo u sindrom, a kao takav nema uzročnog liječenja. Smisao nakon postavljanja dijagnoze je nadzor fetalne ugroženosti i postupak ovisno o tome, a ne o morfoloiji ili EFW-u. Dijagnoza IUZR-a je morfološka, a intervencija mora biti funkcijska. Jedan od vodećih uzročnika perinatalnog mortaliteta i morbiditeta je IUZR-a. Novorođenčad iz trudnoća kompliciranih IUZR-om češće ima perinatalnu hipoksiju, hipotermiju, hipoglikemiju i respiratorni distress sindrom što u konačnici ima lošiji perinatalni ishod. Pogođen je i kasniji

rast i razvoj ove djece. Provedena istraživanja povezuju ih s poremećajima u postnatalnom razvoju i ponašanju te većoj pojavnosti kroničnih nezaraznih bolesti u odrasloj dobi (arterijske hipertenzije, dijabetes melitusa tipa II, kardiovaskularnih i kronične opstruktivne plućne bolesti) (23).

## 1.3 Preeklampsija

### 1.3.1 Definicija i klasifikacija

Prema klasifikaciji ACOG (The American Congress of Obstetricians and Gynecologists), PE je jedan od pojavnih oblika hipertenzivnih bolesti u trudnoći. Pojavljuje se nakon 20. tjedna trudnoće, a traje najkasnije 4-6 tjedana poslije porođaja. Dijagnosticira se vrijednostima sistoličkog tlaka višim od 18,7 kPa i dijastoličkog višim od 12 kPa dva puta u razmaku od 4 sata i proteinurijom koja je viša od 300 mg/24 sata i/ili protein (mg/dl)/ kreatinin (mg/dl)  $\geq$  0,3 ili 1+ na trakici za urin (ako kvantitativna mjerenja nisu moguća). U odsutnosti proteinurije, novonastala hipertenzija uz prisutnost trombocitopenije ( $<100,000/\mu\text{l}$ ), bubrežna insuficijencija (porast serumske razine kreatinina  $> 1,1\text{mg/dl}$ , dvostruko povećanje serumskog kreatinina bez prisutnosti bubrežne bolesti), oštećena jetrena funkcija (dvostruko povećanje jetrenih enzima), plućni edem i simptomi SŽS-a (npr. glavobolja, svjetlaci), također su dijagnostički kriteriji PE-e (24). Na osnovi simptoma, PE-u dijelimo na blagu i tešku prema određenim kriterijima. Blagu PE-u definira povišenje vrijednosti sistoličkog krvnog tlaka višeg od 18,7 kPa i dijastoličkog višeg od 14,7 kPa dva puta u razmaku 4 sata, proteinurijom koja je viša od 300 mg/24 sata i/ili protein (mg/dl)/ kreatinin (mg/dl)  $\geq$  0,3 ili 1+ , bez znakova ugroženosti majke i ploda. Teška PE definira se prema sljedećim kriterijima: vrijednost sistoličkog krvnog tlaka viša od 21,3 kPa i dijastoličkog viša od 14,7 kPa dva puta u razmaku od 4 sata; oštećenom jetrenom funkcijom (povećani jetreni enzimi 2 puta više od normalnih vrijednosti), bol u epigastriju, progresivna renalna insuficijencija (serumska koncentracija kreatinina  $> 1.1\text{ mg/dl}$  ili udvostručenje vrijednosti kreatinina u odsutnosti bubrežne bolesti), pojava cerebralnih i očnih poremećaja, plućni edem i trombocitopenija ( $<100,000/\mu\text{l}$ ) (25). Prema vremenu pojavljivanja PE dijelimo na ranu (engl. *early onset*) koja se pojavljuje prije 34. tjedna gestacije i kasnu (engl. *late onset*). Rana PE se najčešće klasificira kao teška i često je udružena s IUZR-om. Kasna PE ima blažu kliničku sliku i najčešće nije praćena IUZR-om (24,25).

### 1.3.2 Etiopatogeneza

Incidencija PE-e iznosi 5-14% od čega 10% otpada na ranu PE-u, 25% na tešku, a preostalih 65% na blagu (25). Etiologija PE-e do danas ostaje nerazjašnjena, ali se pretpostavlja da vodeću ulogu u nastanku PE-e ima poremećaj pretvorbe spiralnih arterija (26). Uzrok neadekvatne pretvorbe spiralnih arterija dijelom, a time i PE-e, može biti objašnjen imunološkom teorijom, a dijelom genetskom predispozicijom i čimbenicima okoliša. Imunološka teorija ističe mehanizam koji je sličan reakciji odbacivanja presatka (engl. *Graft Versus Host Disease* – GVHD) (27). U prilog imunološke teorije govori povećana aktivnost prirodnih stanica ubojica (engl. *Natural Killer Cell* - NKC) i povećan broj dendritičkih stanica unutar decidue posteljica iz trudnoća kompliciranih PE-om. Dendritičke stanice su važne u započinjanju specifičnog T-staničnog odgovora na transplantirani antigen (28,29). Prisutnost protutijela na angiotenzin I (engl. *Angiotensin I* - AT 1) antigen dokazana je u posteljicama iz trudnoća kompliciranih PE-om. Ona uzrokuju povećani ulazak  $Ca^{2+}$  u endotelne stanice te onemogućavaju remodeliranje krvnih žila decidue (31). Studije su pokazale da prvorotke s obiteljskom anamnezom PE-e, trudnice s prethodnom opstetričkom anamnezom PE-e kao i supruge muškaraca čije su prijašnje partnerice imale PE-u imaju povećan rizik za nastanak iste što govori u prilog genetske predispozicije (32-34). Među čimbenicima značajnim za razvoj PE-e ističu se topljivi fms - kinaze tirozin -1 tropni protein (engl. *soluble Fms - Like Tyrosine Kinase-1* - sFlt-1) čiji se gen nalazi na 13. kromosomu. Žene koje nose djecu s trisomijom 13 imaju povećan rizik za nastanak PE-e (35). Nekoliko drugih gena, kao što je gen koji kodira angiotenzin, endotelnu i staničnu nitrit oksigenazu te geni za trombofilije, također su vezani za nastanak PE-e (36).

Izostankom fiziološke pretvorbe, spiralne arterije zadržavaju tzv. „jet“ cirkulaciju (po Borelu) koja podrazumijeva snažni, brzi i uski mlaz tijekom sistole i vrlo mali ili izostali protok tijekom dijastole. Snaga sistoličkog udara mehanički oštećuje resice u području iznad sebe, čime dijelovi oštećenog TB-a odlaze u majčinu cirkulaciju preko interviloznog prostora, dok TB između pojedinih spiralnih jet cirkulacijskih područja postaje hipoksičan. Na taj način TB je dvostruko oštećen: mehanički i hipoksijom, a rezultat je isti: ulazak TB-a u krvotok majke. Preeklampsija, koja nastaje kao posljedica neadekvatne pretvorbe spiralnih arterija, može se predvidjeti u drugom tromjesečju mjerenjem indeksa otpora maternične arterije (lat. *a. uterina*), a vezana je za nastanak rane PE-e i najčešće je udružena s razvojem IUZR-a (37).

Intervilozni prostor u PE-i obilježen je razdobljima ishemije i reperfuzije, a slijedom toga vremenskim i prostornim varijacijama  $pO_2$ . Hipoksija posteljичnog tkiva, koja nastaje u

razdobljima ishemije posteljice, neposredno utječe na nastanak slobodnih kisikovih radikala (engl. *Reactive Oxygen Radicals*- ROR) koji imaju značajnu ulogu u reperfuzijskoj ozljedi posteljice. Reperfuzija rezultira disfunkcijom endotela i aktivacijom upalnog odgovora što uzrokuje povećano stvaranje citokina i drugih upalnih medijatora poput tumor nekrotizirajućeg čimbenika  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukina 6 (IL-6) i interleukina 10 (IL-10). Bitnu ulogu u upalnom odgovoru imaju i derivati arahidonske kiseline kao što su prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) i tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) koji mogu nastati ili kao produkt lipidne peroksidacije ili zbog "down" regulacije ciklooksigenaze-1 (COX-1) koju, između ostalog, uzrokuje i hipoksija (38-40).

Posteljično tkivo na hipoksiju odgovara ubrzanim životnim ciklusom TB-a. Posljedično tome jedan dio TB-a ne prolazi kompletan put apoptoze već ide u nekrozu, poznatiju kao aponekroza i kao takav otpušta se u cirkulaciju majke (4). Otpuštanje aponekrotskih čestica zajedno s direktnim ulaskom TB-a u cirkulaciju majke, povećava koncentraciju "cell free" DNA, sFlt-1 i drugih toksičnih sincicijskih proteina. Gore navedeni produkti nastali raspadom TB-a uzrokuju aktivaciju majčinog upalnog odgovora i posljedičnu disfunkciju endotela. Klinička manifestacija PE-e nastaje kao posljedica endotelne disfunkcije (41).

Nastanak PE-e mogu uzrokovati i bolesti majke koje su postojale i prije trudnoće (hipertenzija, antifosfolipidni sindrom, sustavne bolesti, šećerna bolest itd.) (33).

#### **1.4 Receptor inzulinu sličnog čimbenika rasta**

Receptor inzulinu sličnog čimbenika rasta 1 (engl. *Insulin Growth Factor Receptor 1* - IGF1R) je transmembranski receptor molekularne težine 320 kDa, dio je velike obitelji tirozin kinaznih receptora (42). IGF1R se nalazi na TB-u, endotelu krvnih žila posteljičnih resica, stromi resica i decidui. Njegova imunohistokemijska razina je u ovisnosti o gestacijskoj dobi. Najveća imunohistokemijska razina IGF1R-a u posteljici je za vrijeme prvog i trećeg tromjesječja trudnoće (43). Na njega se vežu inzulin vezajući čimbenik rasta I (engl. *Insulin Growth Factor I* - IGFI) i inzulin vezajući čimbenik rasta II (engl. *Insulin Growth Factor II* - IGFII). Aktivacija IGF1R-a u posteljici potiče proliferaciju CTB-a, proliferaciju i migraciju EVTB-a, regulira apoptozu TB-a, povećava preuzimanje aminokiselina, respiracijsku površinu posteljice i propusnost za hranjive tvari. Preko njega se ostvaruje i antiapoptotsko djelovanje IGFI i IGFII u posteljici (44,45). Pred kraj trudnoće, imunohistokemijska razina IGF1R-a je veća u TB-u nego u endotelnim stanicama što nas navodi na zaključak da je

podjednak utjecaj majčinog i fetalnog IGF I i IGFII na stanice TB-a. IGF1R zajedno s IGF I i IGF II, vezajućim proteinima inzulin vezajućeg čimbenika rasta 1-6 (engl. *Insulin Like Growth Factor Binding Proteins 1-6* - IGFBP 1-IGFBP6), receptorom inzulin sličnog čimbenika rasta 2 (engl. *Insulin Growth Factor Receptor 2* - IGF2R), inzulinskim receptorom i hibridom inzulinskog i IGF receptora je dio IGF osi (44). Glavni regulator prenatalnog i postnatalnog rasta je IGF os. Mnogi okolišni signali, uključujući hranjive tvari, kisik, hormone (hormon rasta, kortizol, inzulin, tiroidni hormon i spolne hormone) sudjeluju u regulaciji IGF osi (45). Istraživanja IGF osi u posteljicama trudnoća kompliciranih IUZR-om i PE-om su dokazala poremećen odnos IGFI i vezajućih proteina inzulin vezajućeg čimbenika rasta u odnosu na uredne trudnoće. Dokazana je smanjena koncentracija IGFI u IUZR-u i PE-i. Temljem toga rađena su imunohistokemijska i molekularna istraživanja IGF1R-a na posteljicama PE-e i IUZR-a. Rezultati istraživanja na posteljicama PE-e su pokazala pozitivnu povezanost broja IGF1R-a na VTB-u s masom posteljice i masom novorondjenčeta dok je afinitet vezanja za receptor ostao nepromijenjen, a nije dokazana povezanost u broju receptora i afinitetu vezanja za njega s arterijskim tlakom (46). Za razliku od posteljica PE istraživanja IGF1R-a na posteljicama IUZR-a nisu dala ujednačene rezultate (47,48).

## 1.5 Vaskularni endotelni čimbenik rasta

Vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF) je homodimerni disulfidno-vezujući glikoprotein uključen u angiogenezu i vaskulogenezu, kontrolu mikrovaskularne propustljivosti i vazodilatacije (49,50). Glavni izvor VEGF-a u posteljici su VTB i Hofbauerove stanice. Obitelj VEGF uključuje VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i posteljični čimbenik rasta (engl. *Placenta Growth Factor* - PGF) (51,52). Svoje djelovanje VEGF ostvaruje vezanjem za jedan od tri tipa receptora vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGFR 1-3). Postoji i topljiva forma VEGFR1 (engl. *Soluble Vascular Endothelial Growth Factor* - sFlt1 ili sVEGFR1) koja nastaje alternativnom obradom mRNA i kodira samo izvanstanični dio receptora. sFlt1-om vežući VEGF i PGF onemogućava njihovo djelovanje (53,54).

Razina VEGF-a u posteljičnom tkivu ovisi o dobi trudnoće, a razlike u njegovoj koncentraciji reguliraju vaskulogenezu i prijelaz granajuće u negranajuću angiogenezu (50). Najizraženiji je u prvom tromjesečju trudnoće, kada se veže na VEGFR2 receptor endotelnih i mezenhimalnih

stanica i Flt-1 receptor primitivnih vaskularnih lumena i tračaka angiogenih stanica (51). Nastajanje početnih vaskularnih izdanaka navođeno je sFlt-1 koji vjerojatno izravno regulira vaskulogenezu (53).

Napredovanjem trudnoće snižava se razina VEGF-a i VEGFR2 u posteljičnom tkivu što vodi padu koncentracije slobodnog VEGF-a u majčinom serumu. Za razliku od VEGF-a, razina Flt-1 i PGF-a u posteljičnom tkivu raste, kao i koncentracija PGF-a u majčinom serumu koja ima nagli skok između 28. i 32. tjedna trudnoće. Od 33. do 36. tjedna prisutan je i porast sFlt-1 u majčinoj cirkulaciji koji vjerojatno pridonosi smanjenju slobodnog VEGF-a (51,52,54).

Decidualne stanice (DC) također izražavaju samo VEGF za razliku od EVTB-a koji izražava VEGF i Flt-1. Osim uloge u angiogenezi i vaskulogenezi, VEGF sudjeluje u proliferaciji, diferencijaciji i funkciji TB-a (52).

Istraživanja na posteljicama trudnoća kompliciranih I-IUZR-om pokazala su povećanu imunohistokemijsku razinu VEGF-a u VTB-u, EVTB-u i krvnim žilama posteljičnih resica, dok su istraživanja na posteljicama trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om pokazala manju imunohistokemijsku razinu VEGF-a u istraživanim dijelovima posteljice (55,56).

## 1.6 Sustav Fas/FasL

Fas (CD 95) je tip I transmembranskog proteina i pripada super obitelji TNF-a. FasL je tip II transmembranskog proteina koji pripada TNF i CD40 ligand obitelji (57). Sustav Fas/FasL smatra se posrednikom u imunološkoj toleranciji majke na fetus. Izražen je na NK stanicama, aktiviranim T-limfocitima i na imunološki privilegiranim mjestima kao što su oko, mozak i posteljica (58,59). FasL izražen na površini stanice može biti proteolitički razgrađen matriks metaloproteinazom (engl. *Matrix Metalloproteinase* - MMP) i kao takav se pretvara u topljivi FasL (engl. *Soluble FasL* - sFasL) (60). Vezanjem FasL na Fas receptor pokreće se vanjski put apoptoze (4). Imunohistokemijska istraživanja pokazala su da je FasL najizraženiji na VTB-u i EVTB-u u odnosu na ostale dijelove posteljice (61-65). Fas pozitivni T-limfociti smješteni su na majčino-fetalnoj granici gdje sudjeluju u stvaranju imunološke tolerancije majke na fetus (63,66). FasL izražen na TB-u može pokrenuti apoptozu u aktiviranim T-limfocitima i tako eliminirati majčine imunološke stanice koje mogu biti senzitivizirane očevim antigenima (64,67,68). To potvrđuje i studija Hunta i sur. koji su dokazali da TB uzrokuje apoptozu na Fas pozitivnim T-limfocitima *in vitro* i da miševi s nedostatkom funkcionalnog FasL-a imaju povećanu infiltraciju T-limfocita na majčino-fetalnoj granici što rezultira

povećanom incidencijom gubitka trudnoće (69). EVTB aktivno kontrolira majčin imunološki odgovor uzrokujući smrt aktiviranih T-limfocita i tako sudjeluje u imunološkoj toleranciji majke na fetus (63,68). Osim uloge u očuvanju majčino-fetalne imunološke barijere, Fas/FasL sudjeluje u pretvorbi spiralnih arterija što su dokazala in vitro i in vivo istraživanja, a i u angiogenezi. Istraživanja su dokazala da se FasL izražen na EVTB veže na Fas receptor endotelnih i glatkih mišićnih stanica spiralnih arterija potičući njihovu apoptozu u svrhu remodelacije istih (70). U prilog tome upućuju studije koje su pokazale da majčin polimorfizam za Fas receptor, koji snižava razinu istog na endotelu, povećava rizik za nastanak PE-e i IUZR-a (69).



## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

Cilj istraživanja bio je odrediti imunohistokemijsku razinu sljedećih čimbenika koji su uključeni u razvoj IUZR-a:

1. Odrediti imunohistokemijsku razinu IGF1R-a u VTB-u i EVTB-u, DC-a, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis* primjenom imunohistokemijskog biljega za IGF1R, u tkivu posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i u tkivu posteljica urednih trudnoća te rezultate međusobno usporediti.

Očekivali smo da će imunohistokemijska razina IGF1R-a biti viša u ispitivanim dijelovima posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om u odnosu na posteljice iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om i u odnosu na posteljice urednih trudnoća.

2. Odrediti imunohistokemijsku razinu VEGF-a u VTB-u, EVTB-u, DC-a, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis* primjenom imunohistokemijskog biljega za VEGF, u tkivu posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i u tkivu posteljica urednih trudnoća te rezultate međusobno usporediti.

Očekivali smo da neće biti razlike u imunohistokemijskoj razini VEGF-a u istraživanim dijelovima posteljica između posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i posteljica iz urednih trudnoća.

3. Odrediti imunohistokemijsku razinu Fas-a i FasL-a u VTB-u i EVTB-u, DC-a, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis* primjenom imunohistokemijskih biljega Fas i FasL, u tkivu posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i tkivu posteljica iz urednih trudnoća te rezultate međusobno usporediti.

Očekivali smo da neće biti razlike u imunohistokemijskoj razini Fas-a u istraživanim dijelovima posteljica između posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i posteljica urednih trudnoća. Očekivali smo da će imunohistokemijska razina FasL-a biti viša u ispitivanim dijelovima posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om u odnosu na posteljice urednih trudnoća, a snižena u posteljicama iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om u odnosu na posteljice iz urednih trudnoća.

4. Odrediti povezanost imunohistokemijske razine IGF1R-a s FasL-om u VTB-u, EVTB-u, DC-a, krvnim žilama posteljičnih resica, krvnim žilama *decidue basalis* u posteljicama iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i posteljicama urednih trudnoća te rezultate međusobno usporediti.

Očekivali smo da neće biti povezanosti između imunohistokemijske razine IGF1R-a i FasL-a u VTB-u, EVTB-u, DC-a, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis* posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i posteljica iz urednih trudnoća.

5. Odrediti ukupan broj krvnih žila posteljičnih resica i broj resica te njihov omjer na 10 vidnih polja velikog povećanja u posteljicama trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i posteljicama urednih trudnoća te rezultate međusobno usporediti i istražiti povezanost omjera broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica s imunohistokemijskom razinom IGF1R-a i VEGF-a u ispitivanim dijelovima posteljice.

Očekivali smo da će postojati povezanost između imunohistokemijske razine IGF1R-a u ispitivanim dijelovima posteljice iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR + PE-om i urednih trudnoća s omjerom broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica.

Nismo očekivali povezanost između imunohistokemijske razine VEGF-a u ispitivanim dijelovima posteljice iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i urednih trudnoća s omjerom broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica.

### 3. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

#### 3.1 Materijal

Materijal predstavlja 30 posteljica iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om, 30 posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om i 60 posteljica urednih trudnoća iz poroda u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Split odabranih prema dolje navedenim kriterijima.

*Kriteriji uključenja u studiju:*

A) Klinička dijagnoza I-IUZR-a:

- porođajna masa manja od 10. percentila s obzirom na spol, dob trudnoće i paritet majke prema referentnim vrijednostima Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a Split (71).

B) Klinička dijagnoza IUZR+PE:

- arterijska hipertenzija u prethodno normotenzivnih žena (sistolčki tlak  $\geq 140$  mmHg, dijastolički  $\geq 90$  mmHg), u dva mjerenja u razmaku duljem od četiri sata,
- proteinurija ( $\geq 300$  mg/24 satnom urinu ili  $\geq 1+$  na test traci za proteine u urinu) (24),
- porođajna masa manja od 10. percentila s obzirom na spol, dob trudnoće i paritet majke prema referentnim vrijednostima Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a Split (71).

*Kriteriji isključenja iz studije:*

- Arterijska hipertenzija i druge bolesti krvožilnog i bubrežnog sustava koje su postojale prije trudnoće.
- Trombofilije: nasljedne i stečene. Nasljedne trombofilije dijele se na visokorizične i niskorizične. Visokorizične uključuju: nedostatak antitrombina, prisutnost mutacije za heterozigotnost protrombina i faktora V Leiden, homozigot za faktor V Leiden. U niskorizične trombofilije se ubrajaju: heterozigotnost za faktor V Leiden, heterozigotnost za protrombin G20210A, nedostatak proteina C i S, homozigotnost za 4G/4G mutaciju u inhibitoru aktivatora plazminogena (PAI-1), hiperhomocistonemija (mutacija gena za metilentetrahidrofolat reduktazu C677T MTHFR). Stečene trombofilije podrazumijevaju: antifosfolipidni sindrom čija se dijagnoza postavlja prema prisutnosti jednog ili više kliničkih i laboratorijskih kriterija: vaskularna tromboza, gubitak jedne ili više trudnoća oko 10. tjedna trudnoće s urednom fetalnom morfologijom, jedan ili više prijevremenih porođaja zbog eklampsije, PE-e ili posteljicne insuficijencije, tri ili više gubitaka trudnoće prije 10. tjedna trudnoće s

majčinih urednim anatomskim i hormonalnim statusom i isključenim kromosomskim anomalijama majke, prisutnost lupus antikoagulant, antikardiolipinska protutijela (aCL) i anti-beta-2 glikoprotein protutijela u plazmi 2 ili više puta u posljednjih 12 tjedana (72,73).

- Višeplođova trudnoća.
- Sindrom HELLP (LDH  $\geq 600$  IU/L), povišene vrijednosti jetrenih enzima (AST i ALT dva puta više od normalnih vrijednosti), trombocitopenija (broj trombocita  $\leq 100 \times 10^9$  /L), anemija, dva od tri navedena pokazatelja za hemolizu: snižen serumski haptoglobin, povišen serumski bilirubin, shistociti u perifernom razmazu (24).
- Klinički i laboratorijski znakovi sindroma intraamnijske infekcije uključuju sljedeće: trudnica s tjelesnom temperaturom  $\geq 39^\circ$  C ili tjelesnom temperaturom  $\geq 38^\circ$  C i  $\leq 39^\circ$  C u dva uzastopna mjerenja u razdoblju od 30 min bez drugog poznatog uzroka povišenja tjelesne temperature, osnovna srčana fetalna frekvencija  $>160$ / min isključujući akceleracije, deceleracije i razdoblja izrazite varijabilnosti, leukociti (L)  $>15 \times 10^6$  u majčinoj krvi, gnojni sadržaj iz cervikalnog kanala prilikom pregleda u spekulu. Dijagnoza se potvrđuje Gramm pozitivnim obojenjem plodove vode, smanjenom koncentracijom glukoze u plodovoj vodi i visokim brojem leukocita u plodovoj vodi i patohistološkim nalazom korioamnionitisa stadija 2 ili 3, gradusa višeg od 1 (74).
- Gestacijski dijabetes određen prema kriterijima International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Group: povišenje jedne ili više vrijednosti glukoze u plazmi iznad referentne vrijednosti nakon oralnog opterećenja sa 75 g glukoze (natašte  $\geq 5,1$  mmol/l, nakon 1 h  $\geq 10,0$  mmol/l i nakon 2 h  $\geq 8,5$  mmol/l ) (75).
- Ostali poremećaji trudnoće osim gore spomenutih.

Kontrolnu skupinu čine posteljice iz jednoplođovih urednih trudnoća s porođajnom masom od 10. do 90. percentila, koje odgovaraju svim kriterijima isključenja iz istraživanja.

Na osnovi rezultata pilot studije određena je veličina uzorka (76). Procjena potrebne veličine provedena je uz pomoć računalnog programa G\*Power 3.1.2.

## **3.2 Metode istraživanja**

### **3.2.1 Obrada i patohistološka analiza tkiva**

Po završetku porođaja posteljice su stavljene u dovoljno veliku posudu s 10% puferiranim formalinom i upućene na Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Odjel za patologiju. Nakon fiksiranja i makroskopskog pregleda posteljica uzeti su uzorci tkiva prema standardnom protokolu za preuzimanje tkiva posteljica (77). Nakon obrade u histokinetu tkivo je uklopljeno u parafin i rezano rotacijskim mikrotomom na 4 µm, nakon čega je obojeno hemalaun-eozinom. Za mikroskopsku analizu preparata korišten je mikroskop marke Olympus BX41. Broj resica i broj krvnih žila po resici određen je na 10 vidnih polja povećanja objektivna 40X uz pomoć programa Cell D1 Image analysis (Olympus).

### **3.2.2 Imunohistokemijsko bojenje**

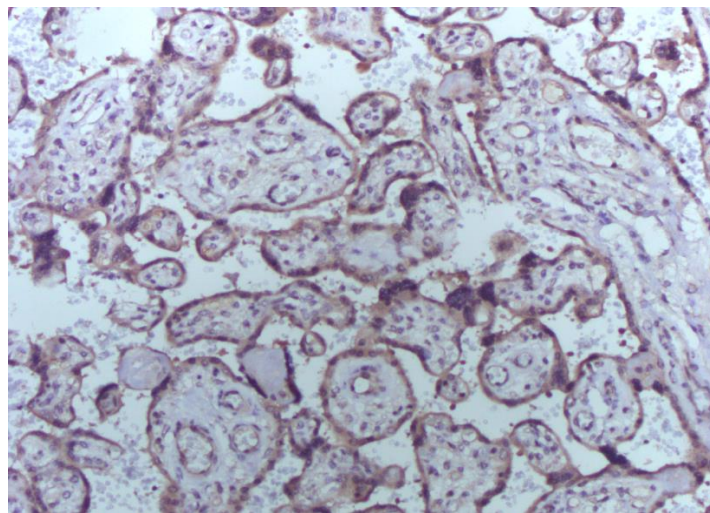
Za imunohistokemijsku analizu uzorka svake posteljice uzet je po jedan parafinski rez iz središnjeg dijela posteljice te je postavljen na super frost plus stakalce (Thermoscientific, Njemačka). Daljnja obrada vršila se u automatskom bojaču (Ventana Bench Mark Ultra autostainer, Ventana Roche, Tucson, Arizona, SAD) univerzalnim sekundarnim protutijelom (Universal DAB detection kit, Ventana, SAD) uz primjenu sljedećih primarnih protutijela:

- a) zečjeg monoklalnog protutijela IGF1R (klon G11, Ventana, SAD) s tvorničkim razrjeđivačem (S2022 Antibody diluent, DAKO, Danska),
- b) zečjeg poliklalnog protutijela VEGF (ab46154, Abcam, Engleska) u razrjeđenju 1:500 s tvorničkim razrjeđivačem (S2022 Antibody diluent, DAKO, Danska),
- c) mišjeg monoklalnog protutijela Fas (klon GM30, Leica, Engleska) u razrjeđenju 1:75 s tvorničkim razrjeđivačem (S2022 Antibody diluent, DAKO, Danska),
- d) mišjeg monoklalnog protutijela FasL (klon 5D1, Novocastra, Engleska) u razrjeđenju 1:50 s tvorničkim razrjeđivačem (S2022 Antibody diluent, DAKO, Danska),
- e) mišjeg monoklalnog protutijela CD31 (klon JC70A, Dako, Danska) u razrjeđenju 1:50 s tvorničkim razrjeđivačem (S2022 Antibody diluent, DAKO, Danska).

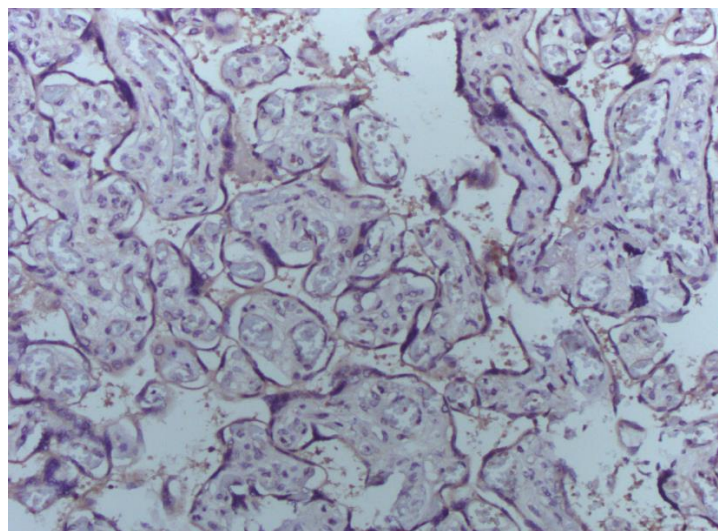
Nakon toga slijedilo je ispiranje u vodi, dehidracija u gradijentu 96% i 100% alkohola, tretiranje ksilolom i pokrivanje Mount Mounting Mediumom i pokrovnicom.

Za IGF1R, VEGF, Fas, CD31 pozitivnom reakcijom smatrala se smeđa obojenost membrane stanica. Tkivo posteljice iz uredne trudnoće koristilo se kao pozitivna kontrola za IGF1R, VEGF, CD31 te tkivo tankog crijeva za Fas. Pozitivnom reakcijom na FasL smatrala se smeđa obojenost membrane i citoplazme stanica. Kao pozitivna kontrola koristilo se tkivo prostate.

Endotelne stanice krvnih žila posteljičnih resica i krvnih žila *decidue basalis* prikazane su uporabom protutijela CD31 (Slika 5a i 5b).



Slika 5a. Jaki intenzitet obojenja stanica VTB-a i krvnih žila - HSCORE=4 (x200)



Slika 5b. Slabi intenzitet obojenja stanica VTB-a i krvnih žila - HSCORE=2 (x200)

Uporabom protutijela za IGF1R, VEGF, Fas i FasL ispitana je imunohistokemijska razina istih u VTB-u i krvnim žilama posteljičnih resica te u EVTB-u, krvnim žilama *decidue basalis* i u DC-ma (Slike 6, 7, 8, 9, 10).

Imunohistokemijska razina gore navedenih antigena opisana je pomoću HSCORE-a, koji se računa prema formuli:  $HSCORE = \sum P_i(i+1)$ , gdje oznaka „i“ predstavlja intenzitet obojenja procijenjen s 1, 2 ili 3 (slabo, umjereno, jako), a „Pi“ umnožak postotaka obojenja svakog intenziteta (78). Uvrštavanjem u formulu za HSCORE dobivena je nova vrijednost čija je maksimalna vrijednost 4, a označava najjači intenzitet obojenja stanica te minimalna čija je vrijednost 1 i znači da se stanice ne bojavu zadanim protutijelom.

### 3.2.3 Statistički postupci

Odstupanje istraživanih numeričkih varijabli od normalne razdiobe utvrdili smo Shapiro-Wilk testom. Za usporedbu vrijednosti numeričkih varijabli između tri ispitivane skupine koristili smo Kruskal-Wallis test, a za *post hoc* analizu Mann-Whitney U-test. Prikazali smo razliku medijana i odgovarajući 95% raspon pouzdanosti (engl. *Confidence Interval* - CI) razlike izračunat metodom koju su preporučili Bonett&Price (2002) (79). Jakost veze izračunata je po formuli  $R = Z/\sqrt{n}$ . Prilagodba za dob trudnoće napravljena je multivarijantnom binarnom logističkom regresijom. Za utvrđivanje povezanosti dviju numeričkih varijabli koristili smo Spearmanov koeficijent korelacije.

Pearsonov koeficijent korelacije koristi se kada između ispitivanih varijabli promatranog modela postoji linearna povezanost i neprekidna normalna distribucija. Vrijednost Pearsonovog koeficijenta korelacije kreće se od +1 (savršena pozitivna korelacija) do -1 (savršena negativna korelacija). Predznak koeficijenta upućuje nas na smjer korelacije, je li pozitivna ili negativna, ali nas ne upućuje na snagu korelacije. Spearmanov koeficijent korelacije (produkt rang korelacije) koristi se za mjerenje povezanosti između varijabli u slučajevima kada nije moguće primijeniti Pearsonov test. Bazira se na tome da se izmjeri dosljednost povezanosti između poredanih varijabli, a oblik povezanosti (npr. linearni oblik koji je preduvjet za korištenje Pearsonovog koeficijenta) nije bitan. Slučajevi u kojima se koristi Spearmanov koeficijent ( $\rho$ ,  $r_s$ ) ili korelacija ranga su npr. kada među varijablama ne postoji linearna povezanost, a nije moguće primijeniti odgovarajuću transformaciju kojom bi se povezanost prevela u linearnu tj. kad jedan od skupa podataka slijedi ordinalnu ljestvicu ili kada raspodjela podataka značajno odstupa od normalne raspodjele te postoje podatci koji

značajno odstupaju od većine izmjerenih. Prilikom tumačenja vrijednosti koeficijenta korelacije vrijede ista pravila za Pearsonov i Spearmanov koeficijent korelacije. Uobičajeno se smatra kako vrijednost  $R$  od 0 do 0,25 ili od 0 do -0,25 upućuje na nepostojanje povezanosti, dok vrijednost  $R$  od 0,25 do 0,50 ili od -0,25 do -0,50 upućuje na slabu povezanost među varijablama. Vrijednost  $R$  od 0,50 do 0,75 ili od -0,50 do -0,75 upućuje na umjerenu do dobru povezanost te vrijednost  $R$  od 0,75 do 1 ili od 0,75 do -1 upućuje na vrlo dobru do izvrsnu povezanost među varijablama.

Rezultati su prikazani tablično i interpretirani na razini značajnosti  $P < 0,05$ . Za statističku obradu koristio se statistički paket Statistica 7.0 (SPSS, Chicago, IL).



## 4. REZULTATI

U Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Split, poštujući kriterije uključenja i isključenja iz studije, prikupljene su posteljice i podatci iz 30 trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om, 30 trudnoća kompliciranih I-IUZR-om i 60 urednih trudnoća koje su predstavljale kontrolnu skupinu. Obrada i analiza posteljica učinjena je u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split.

### 4.1 Demografska obilježja skupina

Nije nađena statistički značajna razlika između roditelja ispitivanih skupina prema životnoj dobi ( $\chi^2= 3,14$ ;  $P=0,208$ ) i paritetu ( $\chi^2=2,3$ ;  $P=0,321$ ). Postojala je statistički značajna razlika između roditelja ispitivanih skupina prema dobi trudnoće kod porođaja ( $\chi^2=29,9$ ;  $P<0,0001$ ). *Post-hoc* analizom utvrđeno je da su roditelje s IUZR + PE-om imale statistički značajno manju dob trudnoće kod porođaja od roditelja s I-IUZR-om ( $Z=4,5$ ;  $P<0,001$ ) i od roditelja kontrolne skupine ( $Z=5,1$ ;  $P<0,001$ ). Nismo dokazali statistički značajnu razliku u dobi trudnoće kod porođaja između roditelja s I-IUZR-om i roditelja kontrolne skupine ( $Z=0,488$ ;  $P=0,99$ ) (Tablica 1).

Tablica 1. Demografska obilježja ispitivanih skupina

	I-IUZR (n=30)	IUZR + PE (n=30)	Kontrola (n=60)	$P^*$
Dob roditelje (godina)	27,5 (21-36)	31,5 (22-48)	29 (19-40)	0,208
Paritet (broj rođene djece)	1 (1- 3)	1 (1-5)	1 (1-3)	0,321
Dob trudnoće kod porođaja (tjedni)	38,5 (37-41) <sup>+</sup>	36,5(32-39) <sup>+</sup>	38(37-41) <sup>+</sup>	<0,0001

Podatci su izraženi kao medijan (minimalna i maksimalna vrijednost).

\* Kruskal-Wallis test

<sup>+</sup>  $P<0,001$  između IUZR+PE i I-IUZR ; IUZR+PE i kontrolne skupine (Mann-Whitney U-test)

#### 4.2 Imunohistokemijska razina IGF1R-a u DC-ma, VTB-u, EVTB-u, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis* ispitivanih posteljica

Imunohistokemijska razina IGF1R-a u DC-ma ( $\chi^2=6,7$ ;  $P=0,035$ ), VTB-u ( $\chi^2=11,5$ ;  $P=0,003$ ), EVTB-u ( $\chi^2=11,8$ ;  $P=0,003$ ), krvnim žilama posteljičnih resica ( $\chi^2=8,2$ ;  $P=0,017$ ) i krvnim žilama *decidue basalis* ( $\chi^2=24,5$ ;  $P<0,001$ ) statistički se značajno razlikovala u istraživanim dijelovima posteljica kompliciranih: IUZR+PE-om, IUZR-om i u posteljicama urednih trudnoća (Tablica 2), (Slike 6 i 7).

Tablica 2. Imunohistokemijska razina IGF1R-a u decidualnim stanicama (DC), resičnom trofoblastu (VTB), izvanresičnom trofoblastu (EVTB), krvnim žilama posteljičnih resica (KŽ), krvnim žilama *decidue basalis* (KŽDEC) posteljica trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i kontrolnim posteljicama

	I-IUZR (n=30)	IUZR+PE (n=30)	Kontrola (n=60)	$P^*$
DC	3,9(1,5-4)	3(2-4)	3,8(2-4)	0,035
VTB	3,8(2-4)	3(2,1-3,8)	3,5(1-4)	0,003
EVTB	4 (2-4)	3(2-4)	3,8(2-4)	0,017
KŽ	2,9(1,8-4)	2(2-3,8)	2,5(1-3,8)	<0,001
KŽDEC	3,5(1,5-4)	2,5(2-4)	3(1-3,5)	0,003

Podatci su prikazani kao medijan (minimalna i maksimalna vrijednost).

\* Kruskal-Wallis test

Imunohistokemijska razina IGF1R-a je statistički značajno viša u DC-ma ( $Z=2,5$ ;  $R=0,32$ ;  $P=0,013$ ), VTB-u ( $Z=3,5$ ;  $R=0,5$ ;  $P<0,001$ ), EVTB-u ( $Z=3,4$ ;  $R=0,44$ ;  $P=0,001$ ), krvnim žilama posteljičnih resica ( $Z=2,7$ ;  $R=0,35$ ;  $P=0,007$ ) i krvnim žilama *decidue basalis* ( $Z=4,1$ ;  $R=0,53$ ;  $P<0,001$ ) posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om nego u skupini posteljica iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om. Logističkom regresijom uz prilagodbu za dob trudnoće kod porođaja potvrdili smo statistički značajnu razliku imunohistokemijske razine IGF1R-a u VTB-u, EVTB-u, krvnim žilama *decidue basalis* i krvnim žilama posteljičnih resica posteljica iz trudnoća kompliciranih s I-IUZR-om i IUZR+PE-om. Nije potvrđena razlika u DC-ma između posteljica ove dvije skupine ( $P=0,111$ ) (Tablica 3).

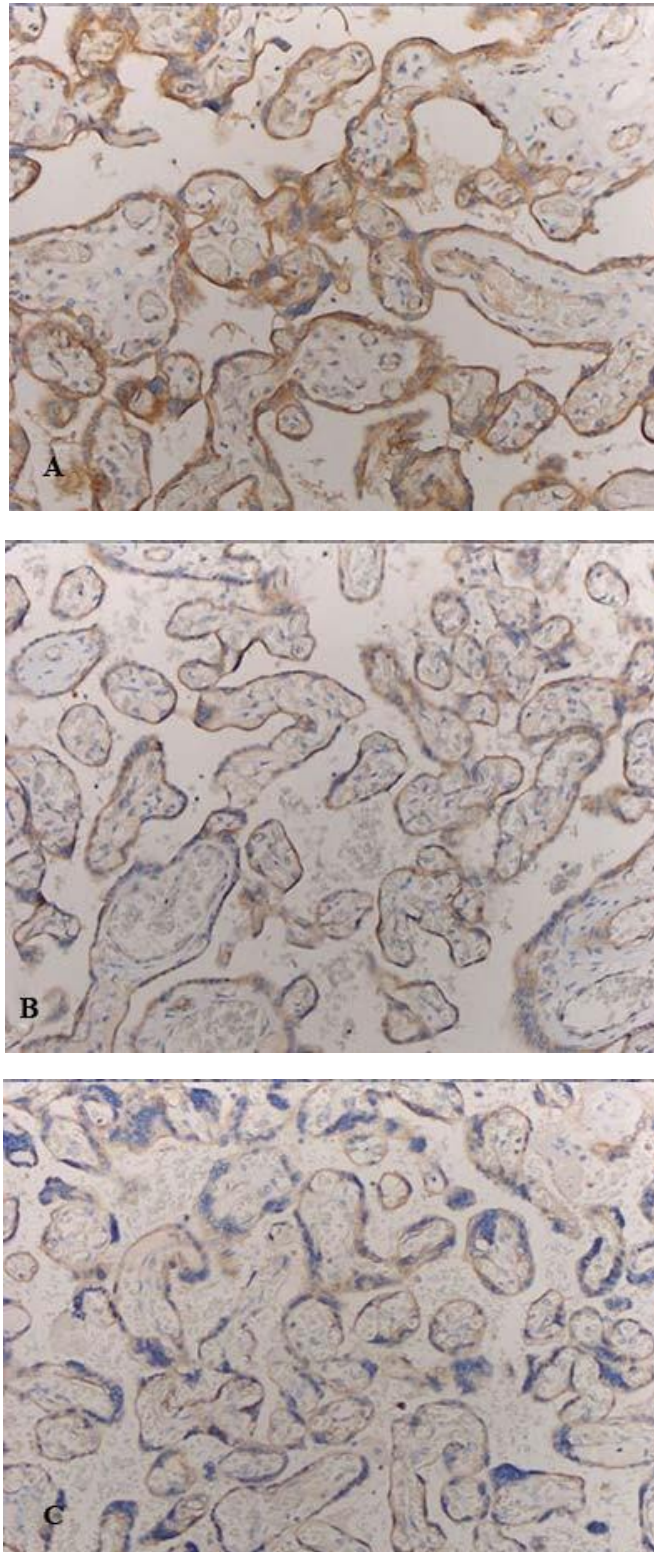
Tablica 3. Prikaz razlika medijana i 95% CI imunohistokemijskog izražaja IGF1R-a između ispitivanih posteljica trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i kontrolnim posteljicama.

	I-IUZR i IUZR+PE	$P^a$	$P^b$
DC	0,9 (0,65-1,35)	0,013	0,111
VTB	0,8 (0,41-1,09)	<0,001	0,036
KŽ	0,9 (0,61-1,29)	0,007	0,011
KŽDEC	1 (0,32-1,68)	<0,001	0,003
EVTB	1 (0,65-1,35)	0,001	0,044
I-IUZR i Kontrola			
KŽ	0,4 (-1,01 do 0,11)	0,035	
KŽDEC	0,5 (-0,02 do 1,02)	<0,001	
EVTB	0,2 (-0,42 do 0,02)	0,025	

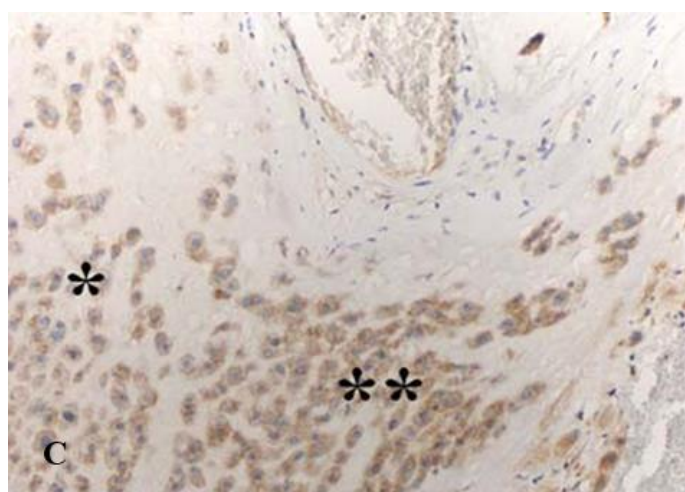
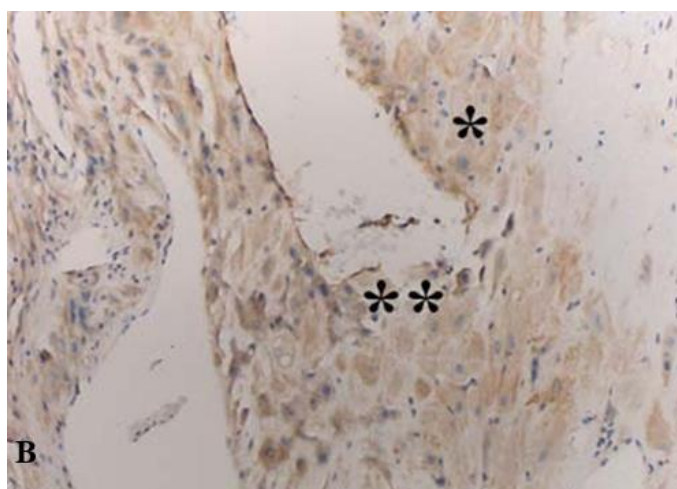
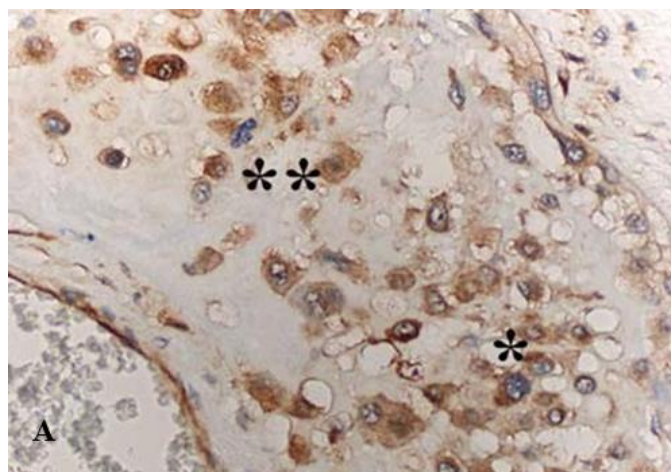
<sup>a</sup>- Mann Whitney U-test ; <sup>b</sup>- logistička regresija prilagođena za gestacijsku dob.

Nismo dokazali statistički značajnu razliku u imunohistokemijskoj razini IGF1R-a krvnih žila *decidue basalis* ( $Z=1,1$ ;  $P=0,273$ ), krvnih žila posteljičnih resica ( $Z=1,22$ ;  $P=0,224$ ) i EVTB-a ( $Z=1,8$ ;  $P=0,072$ ) posteljica kompliciranih IUZR+PE-om i urednih trudnoća. Statistički značajnu razliku našli smo u DC-ma ( $Z=2,14$ ;  $P=0,033$ ) i VTB-u ( $Z=2,1$ ;  $P=0,037$ ), ali je naknadnom logističkom regresijom uz prilagodbu za dob trudnoće nismo potvrdili ni u DC-ma ( $P=0,071$ ) ni u VTB-u ( $P=0,334$ ).

Imunohistokemijska razina IGF1R-a je statistički značajno viša u krvnim žilama posteljičnih resica ( $Z=2,1$ ;  $R=0,22$ ;  $P=0,035$ ), krvnim žilama *decidue basalis* ( $Z=4,5$ ;  $R=0,47$ ;  $P<0,001$ ) i EVTB-u ( $Z=2,2$ ;  $R=0,23$ ;  $P=0,025$ ) posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om nego u posteljicama iz urednih trudnoća (Tablica 3). U DC-ma ( $Z=0,331$ ;  $P=0,74$ ) i VTB-u ( $Z=1,6$ ;  $P=0,111$ ) posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om i urednih trudnoća nije bilo statistički značajne razlike u imunohistokemijskoj razini IGF1R-a.



Slika 6. Imunohistokemijska razina IGF1R-a u VTB-u i krvnim žilama posteljičnih resica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om – jak intenzitet obojenja (A): posteljica urednih trudnoća – umjeren intenzitet obojenja (B) i posteljica iz trudnoća IUZR+PE-om – slab intenzitet obojenja (C) (x200).



Slika 7. Imunohistokemijska razina IGF1R u *decidui basalis* \*\*, EVTB-u \* i krvnim žilama *decidue basalis* posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om – jak intenzitet obojenja (A): posteljica urednih trudnoća – umjeren intenzitet obojenja (B) i posteljica iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om – umjeren intenzitet obojenja (C) (x200).

### 4.3 Imunohistokemijska razina VEGF-a u DC-ma, VTB-u, EVTB-u, krvnim žilama posteljinih resica i krvnim žilama *decidue basalis* ispitivanih posteljica

Nismo dokazali statistički značajnu razliku vrijednosti imunohistokemijske razine VEGF-a u VTB-u ( $\chi^2=4,3$ ;  $P=0,119$ ), EVTB-u ( $\chi^2=0,778$ ;  $P=0,687$ ) i krvnim žilama posteljinih resica ( $\chi^2=3,5$ ;  $P=0,176$ ) posteljica kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i posteljica urednih trudnoća. Dokazali smo statistički značajnu razliku u imunohistokemijskoj razini VEGF-a u DC-ma ( $\chi^2=11,6$ ;  $P=0,003$ ) i krvnim žilama *decidue basalis* ( $\chi^2= 9,7$ ;  $P=0,008$ ) posteljica iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om, I-IUZR-om i posteljica urednih trudnoća (Tablica 4).

Tablica 4. Imunohistokemijska razina VEGF-a u decidualnim stanicama (DC), resičnom trofoblastu (VTB), izvanresičnom trofoblastu (EVTB), krvnim žilama posteljinih resica (KŽ), krvnim žilama *decidue basalis* (KŽDEC) u posteljicama trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i kontrolnim posteljicama

	I-IUZR (n=30)	IUZR + PE (n=30)	Kontrola (n=60)	<i>P</i> *
DC	4(3-4)	4(1,8-4)	4(2-4)	0,003
VTB	3(2-4)	3,35(1,6-4)	3(1,5-4)	0,119
EVTB	3,9(2,5-4)	4(2-4)	3(1,5-4)	0,687
KŽ	3(1,5-4)	3(1,6-4)	4(2-4)	0,176
KŽDEC	4(2-4)	4(2-4)	4(2-4)	0,008

Podatci su prikazani kao medijan (minimalna i maksimalna vrijednosti).

\* Kruskal-Wallis test

*Post hoc* analizom nismo dokazali statistički značajnu razliku imunohistokemijske razine VEGF-a u DC-ma ( $Z=1,4$ ;  $P=0,161$ ) posteljica iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om i I-IUZR-om, kao ni između ( $Z= 1,81$ ;  $P=0,07$ ) posteljica kompliciranih IUZR+PE-om i urednih trudnoća. Dokazali smo statistički značajnu razliku u imunohistokemijskoj razini VEGF-a u DC-ma ( $Z=3,2$ ;  $P=0,001$ ) između posteljica kompliciranih I-IUZR-om i urednih trudnoća. Kako iz medijana i raspona nije vidljiva razlika u imunohistokemijskoj razini VEGF-a u DC-a posteljica kompliciranih I-IUZR-om i urednih trudnoća koristili smo prosječnu rang vrijednost Kruskal-Wallis testa. Prosječna rang vrijednost za VEGF-a u DC-a I-IUZR-a iznosila je 73,43 a u kontrolnoj skupini je prosječna rang vrijednost iznosila 52,05. Iz prosječne rang vrijednosti se donosi zaključak da je u skupini I-IUZR imunohistokemijska

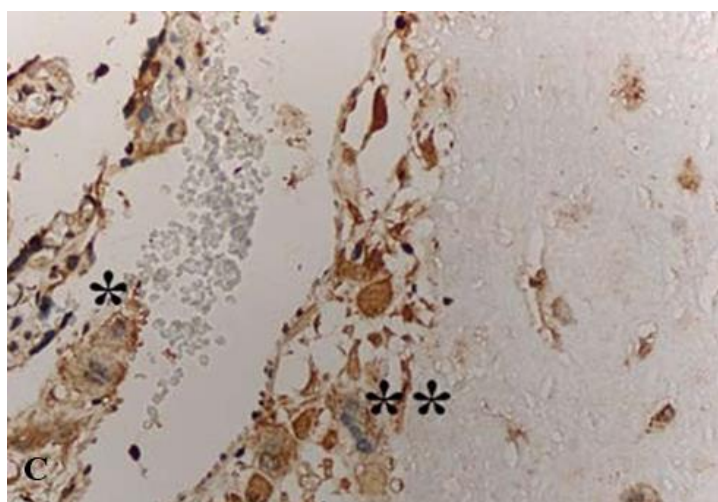
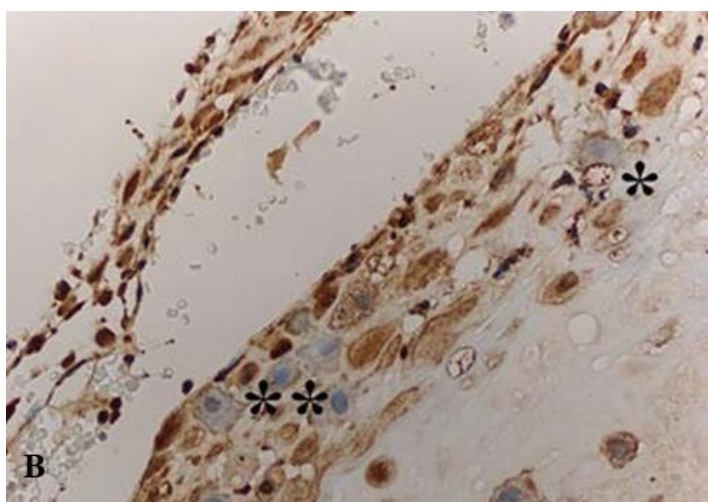
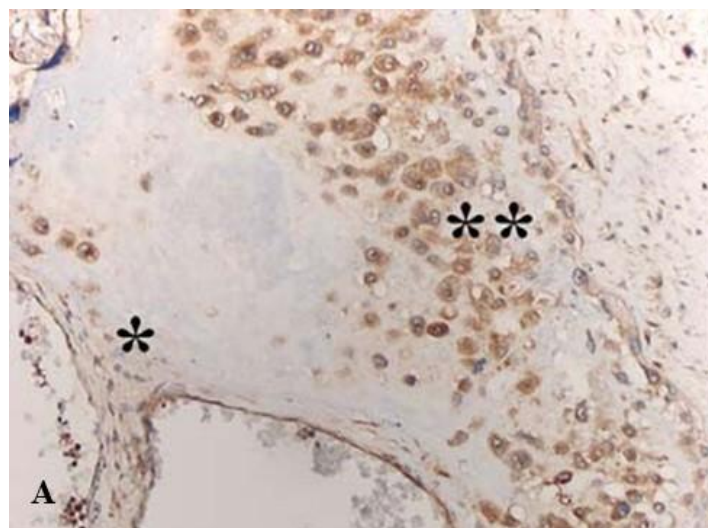
razina VEGF-a u DC-a statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 5). U krvnim žilama *decidue basalis post hoc* analizom nije dokazana razlika u imunohistokemijskoj razini VEGF-a posteljica kompliciranih I-IUZR-om i IUZR+PE-om ( $Z=0,23$ ;  $P=0,818$ ). Dokazana je statistički značajna razlika imunohistokemijske razine VEGF-a u krvnim žilama *decidue basalis* ( $Z=2,4$ ;  $P=0,016$ ) posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om i posteljica urednih trudnoća. S obzirom na to da iz medijana i raspona nije vidljiva razlika između imunohistokemijske razine VEGF-a u krvnim žilama *decidue basalis* posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om i posteljica urednih trudnoća koristili smo prosječnu rang vrijednost Kruskal-Wallis testa imunohistokemijske razine VEGF-a u krvnim žilama *decidue basalis* posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om i posteljica urednih trudnoća. Prosječna rang vrijednost za VEGF-a u krvnim žilama *decidue basalis* posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om iznosila je 63,32, a u posteljicama iz urednih trudnoća je prosječna rang vrijednost iznosila 48,07. Iz prosječne rang vrijednosti se donosi zaključak da je u skupini I-IUZR-a imunohistokemijska razina VEGF-a u krvnim žilama *decidue basalis* statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 5). U krvnim žilama *decidue basalis* posteljica iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om i posteljica iz urednih trudnoća postoji statistički značajna razlika u imunohistokemijskoj razini VEGF-a ( $Z=2,5$ ;  $P=0,012$ ), ali je nismo potvrdili nakon prilagodbe za dob trudnoće ( $P=0,211$ ).

Tablica 5. Prikaz prosječne rang vrijednosti Kruskal-Wallis testa za VEGF-a u decidualnim stanicama (DC) i krvnim žilama *decidue basalis* (KŽDEC) posteljica trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE i kontrolnim posteljicama.

	I-IUZR	Kontrola	$P^a$
DC	73,43	52,05	0,001
KŽDEC	63,43	48,08	0,010

<sup>a</sup> - Mann Whitney U-test





Slika 8. Imunohistokemijska razina VEGF-a u *decidui basalis* \*\*, EVTB-u \* i krvnim žilama *decidue basalis* posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om – jak intenzitet obojenja (A): posteljica urednih trudnoća – jak intenzitet obojenja (B) i posteljica iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om – jak intenzitet obojenja (C) (x200).



#### 4.4 Imunohistokemijska razina Fas-a u DC-ma, VTB-u, EVTB-u, krvnim žilama posteljinih resica i krvnim žilama *decidue basalis* ispitivanih posteljica

Nismo dokazali statistički značajnu razliku u imunohistokemijskoj razini Fas-a u DC-ma ( $\chi^2=2,55$ ;  $P=0,280$ ), VTB-u ( $\chi^2=3,9$ ;  $P=0,142$ ), EVTB-u ( $\chi^2=0,021$ ;  $P=0,989$ ) i krvnim žilama posteljinih resica ( $\chi^2=0,094$ ;  $P=0,954$ ) posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i posteljica urednih trudnoća. Imunohistokemijska razina Fas-a statistički se značajno razlikovala u krvnim žilama *decidue basalis* ( $\chi^2=12,80$ ;  $P=0,002$ ) posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR + PE-om i posteljica urednih trudnoća (Tablica 6). *Post hoc* analizom dokazana je statistički značajno viša imunohistokemijska razina Fas-a u krvnim žilama *decidue basalis* posteljica urednih trudnoća naprama krvnim žilama *decidue basalis* posteljica trudnoća kompliciranih I-IUZR-om. Razlika medijana između imunohistokemijske razine Fas-a u krvnim žilama *decidue basalis* posteljica kompliciranih I-IUZR-om i posteljica urednih trudnoća iznosi 0,7 uz 95% CI:-1,2do-0,5 ( $Z=3,7$ ;  $P<0,001$ ).

Tablica 6. Imunohistokemijska razina Fas-a u decidualnim stanicama (DC), resičnom trofoblastu (VTB), izvanresičnom trofoblastu (EVTB), krvnim žilama posteljinih resica i krvnim žilama *decidue basalis* posteljica trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i kontrolnim posteljicama.

	I-IUZR (n=30)	IUZR+PE (n=30)	Kontrola (n=60)	<i>P</i> *
DC	3,5(2,5-4)	3,25(2-4)	3(2,4-4)	0,280
VTB	2(2-3,9)	2,4(2-3,6)	2,8(2-3,8)	0,142
EVTB	3(2-4)	3,5(2,5-4)	3(2,4-4)	0,989
KŽ	2,9(2,1-3,9)	3(2-4)	3(2-3,9)	0,954
KŽDEC	3(2,5-4,3) <sup>+</sup>	3,5(2-4)	3,7(3-4)	0,002

Podatci su prikazani kao medijan (minimalna i maksimalna vrijednosti).

\*Kruskal-Wallis test

<sup>+</sup>  $P<0,001$  u odnosu na kontrolu (Mann-Whitney U-test)

#### 4.5 Imunohistokemijska razina FasL-a u DC-ma, VTB-u, EVTB-u, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis* ispitivanih posteljica

Imunohistokemijska razina FasL-a u DC-ma ( $\chi^2=50$ ;  $P<0,001$ ), VTB-u ( $\chi^2=46,3$ ;  $P<0,001$ ), EVTB-u ( $\chi^2=51,5$ ;  $P<0,001$ ), krvnim žilama posteljičnih resica ( $\chi^2=47,8$ ;  $P<0,001$ ) i krvnim žilama *decidue basalis* ( $\chi^2=55$ ;  $P<0,001$ ) statistički se značajno razlikovala između posteljica kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i posteljica uredne trudnoće (Tablica 7) (Slike 9 i 10).

Tablica 7. Imunohistokemijska razina FasL-a u decidualnim stanicama (DC), resičnom trofoblastu (VTB), izvanresičnom trofoblastu (EVTB), krvnim žilama posteljičnih resica (KŽ), krvnim žilama *decidue basalis* (KŽDEC) posteljica trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i kontrolnim posteljicama.

	I-IUZR (n=30)	IUZR + PE (n=30)	Kontrola (n=60)	$P^*$
DC	4 (3-4)	2,8(2-4)	2,8(2-3,5)	<0,001
VTB	3,5(3,2-3,8)	2,5(2-3,7)	3,3(3-3,7)	<0,001
EVTB	3,8(2-4)	2,8(2-4)	3,5(1-4)	<0,001
KŽ	3,5(3-3,8)	2,4(2-3,6)	3(2,5-3,5)	<0,001
KŽDEC	3,8(2,8-4)	2(2-3)	3(2-3,5)	<0,001

Podatci su prikazani kao medijan (minimalna i maksimalna vrijednosti).

\* Kruskal-Wallis test

Imunohistokemijska razina FasL-a u DC-ma ( $Z=4,99$ ;  $R=0,64$ ;  $P<0,001$ ), VTB-u ( $Z=5,4$ ;  $R=0,69$ ;  $P<0,001$ ) i EVTB-u ( $Z=5,3$ ;  $R=0,68$ ;  $P<0,001$ ), krvnim žilama posteljičnih resica ( $Z=5,3$ ;  $R=0,68$ ;  $P<0,001$ ) i krvnim žilama *decidue basalis* ( $Z=6,2$ ;  $R=0,80$ ;  $P<0,001$ ) posteljica trudnoća kompliciranih I-IUZR-om viša je nego u posteljicama trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om, a razlika je potvrđena logističkom regresijom uz prilagodbu za dob trudnoće između posteljica trudnoća kompliciranih I-IUZR-om i IUZR+PE-om (Tablica 8).

Imunohistokemijska razina FasL-a je statistički značajno viša u DC-ma ( $Z=7,1$ ;  $R=0,75$ ;  $P<0,001$ ), VTB-u ( $Z=4,3$ ;  $R=0,45$ ;  $P<0,001$ ), EVTB-u ( $Z=7$ ;  $R=0,74$ ;  $P<0,001$ ), krvnim žilama posteljičnih resica ( $Z=5,5$ ;  $R=0,58$ ;  $P<0,001$ ), krvnim žilama *decidue basalis* ( $Z=6,3$ ;

$R=0,66$ ;  $P<0,001$ ), posteljica kompliciranih I-IUZR-om u odnosu na posteljice urednih trudnoća (Tablica 8).

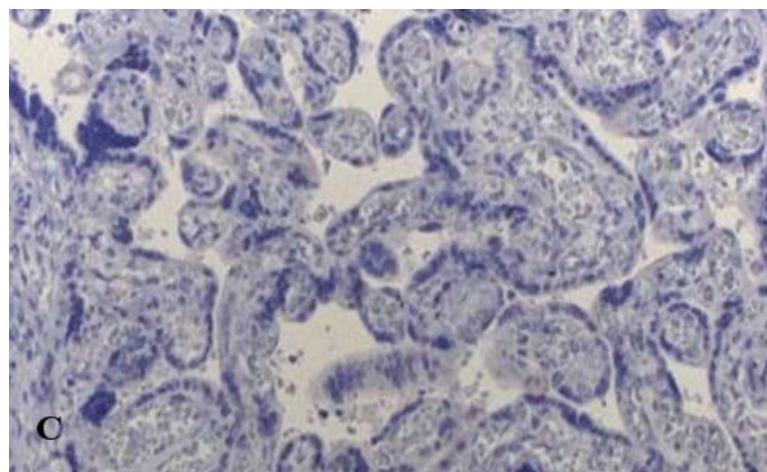
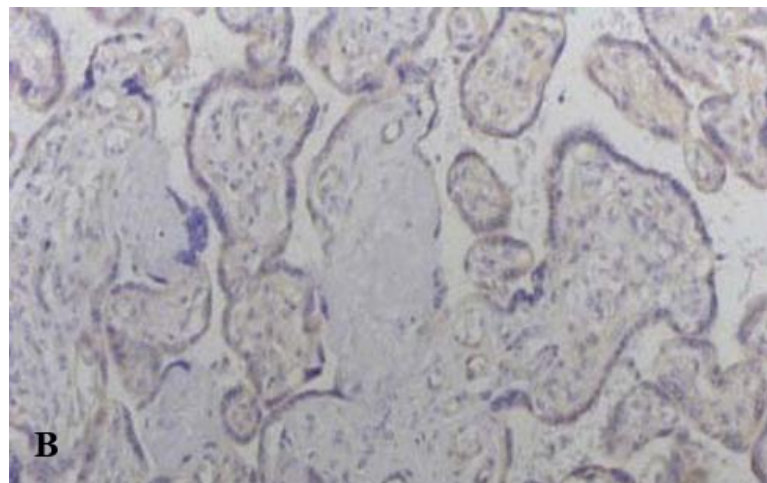
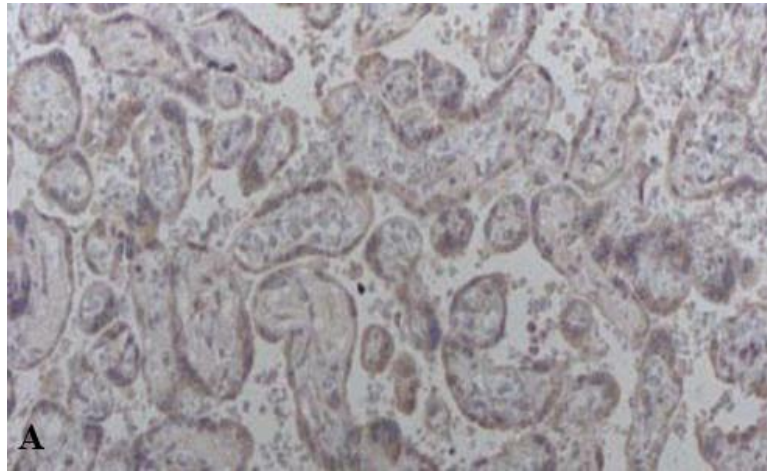
U posteljicama trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om imunohistokemijska razina FasL-a je statistički značajno niža u VTB-u ( $Z=5,1$ ;  $R=0,54$ ;  $P<0,001$ ), krvnim žilama posteljičnih resica ( $Z=4,3$ ;  $R=0,45$ ;  $P<0,001$ ), krvnim žilama *decidue basalis* ( $Z=3,15$ ;  $R=0,33$ ;  $P=0,002$ ) nego u posteljicama urednih trudnoća, a razlika je potvrđena logističkom regresijom uz prilagodbu za dob trudnoće između skupina (Tablica 8). Nismo dokazali statistički značajnu razliku u imunohistokemijskoj razini FasL-a u DC-ma ( $Z=0,57$ ;  $P=0,568$ ) i EVTB-u ( $Z=0,458$ ;  $P=0,647$ ) posteljica trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om i posteljica uredne trudnoće.

Tablica 8. Prikaz razlika medijana i 95% CI za FasL u decidualnim stanicama (DC), resičnom trofoblastu (VTB), izvanresičnom trofoblastu (EVTB), krvnim žilama posteljičnih resica (KŽ), krvnim žilama *decidue basalis* (KŽDEC) posteljica trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i kontrolnim posteljicama.

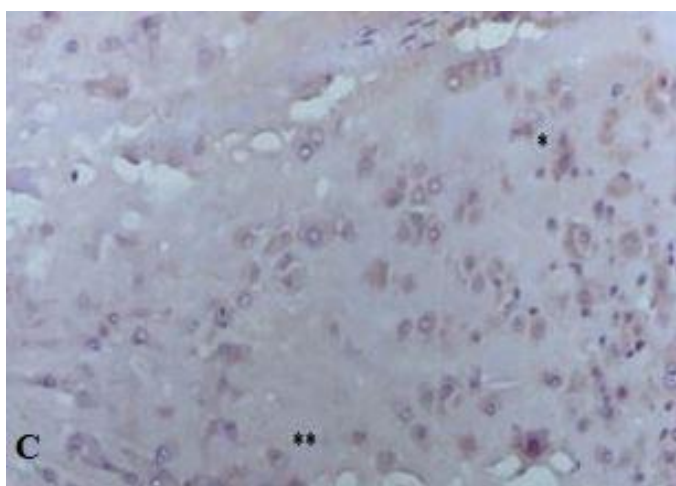
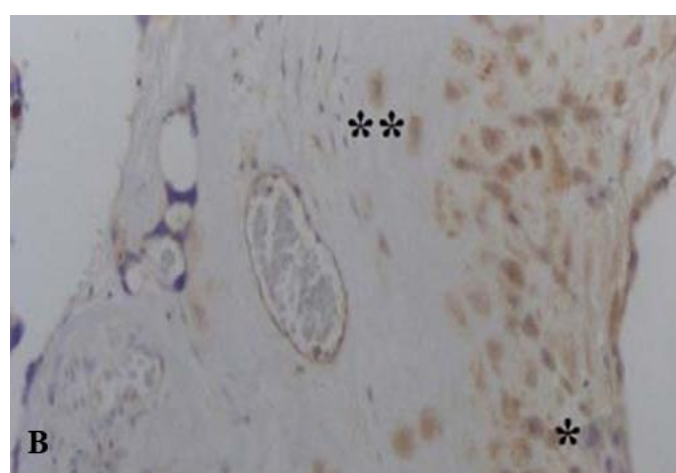
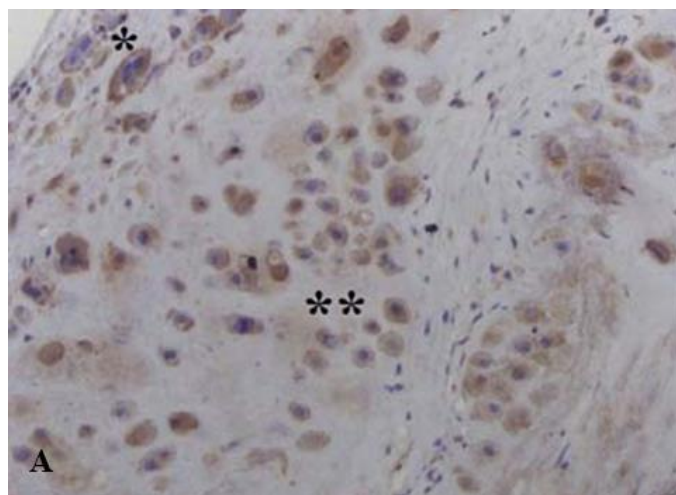
	I-IUZR i IUZR + PE	$P^a$	$P^b$
DC	1,2 (0,94-1,46 )	<0,001	0,001
VTB	1 (0,53-1,42)	<0,001	0,007
EVTB	1 (0,51-1,49)	<0,001	0,001
KŽ	1,1 (0,16-0,24 )	<0,001	0,002
KŽDEC	1,8 (1,46-2,14)	<0,001	0,013
I-IUZR i Kontrola			
DC	1,2 (0,93 – 1,47)	<0,001	
VTB	0,1 (0,04 – 0,34)	<0,001	
EVTB	0,3 (0,99 – 1,61)	<0,001	
KŽ	0,5 ( 0,35 – 0,65)	<0,001	
KŽDEC	0,8 (0,95 – 1,65)	<0,001	
IUZR + PE i Kontrola			
VTB	0,7 (0,36 – 1,21)	<0,001	<0,001
KŽ	0,6 (- 1,1 – 0,12)	<0,001	<0,001
KŽDEC	1 ( - 0,85 – 0,15)	0,002	0,027

Podatci su prikazani kao razlike medijana i 95% CI.

<sup>a</sup> - Mann Whitney U-test ; <sup>b</sup> - logistička regresija prilagođena za gestacijsku dob



Slika 9. Imunohistokemijska razina FasL-a u VTB-u i krvnim žilama posteljičnih resica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-a – jak intenzitet obojenja (A): posteljica urednih trudnoća – umjeren intenzitet obojenja (B) i posteljica iz trudnoća IUZR+PE-om – slab intenzitet obojenja (C) (x200).



Slika 10. Imunohistokemijska razina FasL-a u *decidui basalis* \*\*, EVTB-u \* i krvnim žilama *decidue basalis* posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-a – jak intenzitet obojenja (A): posteljica urednih trudnoća – umjeren intenzitet obojenja (B) i posteljica iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om – slab intenzitet obojenja (C) (x200).

#### 4.6 Povezanost imunohistokemijske razine IGF1R-a s FasL-om u DC-ma, VTB-u, EVTB-u, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis* u ispitivanim posteljicama

Ne postoji statistički značajna povezanost između vrijednosti imunohistokemijske razine IGF1R-a i FasL-a u DC-ma, VTB-u i krvnim žilama posteljičnih resica posteljica trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i kontrolnih posteljica. Postoji statistički značajna negativna povezanost između imunohistokemijske razine IGF1R-a i FasL u EVTB-u posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om (Tablica 9).

Tablica 9. Spearmanov koeficijent korelacije rho (p) imunohistokemijske razine IGF1R-a i FasL-a u decidualnim stanicama (DC), resičnom trofoblastu (VTB), izvanresičnom trofoblastu (EVTB), krvnim žilama posteljičnih resica (KŽ), krvnim žilama *decidue basalis* (KŽDEC) posteljica trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i kontrolnim posteljicama.

	I-IUZR (n=30)	IUZR+PE (n=30)	Kontrola (n=60)
DC	- 0,325 (0,105)	0,229 (0,920)	- 0,058 (0,328)
VTB	0,150 (0,214)	- 0,115 (0,277)	- 0,119 (0,183)
EVTB	- 0,367 (0,023)	0,139 (0,231)	- 0,119 (0,183)
KŽ	0,033 (0,432)	0,180 (0,171)	0,178 (0,087)
KŽDEC	-0,169 (0,185)	-0,075 (0,346)	- 0,196 (0,066)

#### 4.7 Broj resica, broj krvnih žila posteljičnih resica te omjer broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica u ispitivanim posteljicama

Nađena je statistički značajna razlika u broju resica ( $\chi^2=9,2$ ;  $P=0,01$ ) i krvnih žila posteljičnih resica ( $\chi^2=13,3$ ;  $P<0,001$ ) posteljica trudnoća kompliciranih I-IUZR-om i IUZR+PE-om i kontrolnim posteljicama. Između istraživanih skupina nije bilo statistički značajne razlike u omjeru broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica na 10 vidnih polja velikog povećanja ( $\chi^2=3,3$ ;  $P=0,193$ ) (Tablica 10).

*Post hoc* analizom dokazano je da je u posteljicama trudnoća s I-IUZR-om broj krvnih žila posteljičnih resica ( $Z=2,95$ ;  $R=0,38$ ;  $P=0,003$ ) i broj resica statistički značajno veći nego u posteljicama trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om ( $Z=1,95$ ;  $P=0,05$ ) (Tablica 10).

U posteljicama trudnoća kompliciranih I-IUZR-om nakon *post hoc* analize, broj resica ( $Z=3,1$ ;  $R=0,36$ ;  $P=0,002$ ) i broj krvnih žila resica ( $Z=3,4$ ;  $P=0,001$ ) bio je statistički značajno veći nego u posteljicama iz urednih trudnoća (Tablica 10).

Između posteljica trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om i posteljica urednih trudnoća nije nađena statistički značajna razlika u broju krvnih žila posteljičnih resica ( $Z=0,67$ ;  $P=0,445$ ) i broju resica ( $Z=0,51$ ;  $P=0,612$ ) (Tablica 10).

Tablica 10. Broj resica, broj krvnih žila i broj krvnih žila po resici u posteljicama trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i kontrolnim posteljicama

	I-IUZR (n=30)	IUZR+PE (n=30)	Kontrola (n=60)	<i>P</i> *
Broj resica	63,5(23-102) <sup>+</sup>	41 (25-105)	43(27-91)	0,010
Broj krvnih žila	437,5 (322-509,7) <sup>++</sup>	302,5 (235-386)	298 (269-336)	0,001
Broj krvnih žila/ po resici	6,9 (5,6-9,2)	5,7 (5,1-9)	7 (6,7-8,4)	0,193

Podatci su prikazani kao medijani (minimalna i maksimalna vrijednost).

\*Kruskal-Wallis test

<sup>+</sup>  $P=0,003$  u odnosu na IUZR+PE;  $P=0,001$  u odnosu na kontrolu (Mann-Whitney U-test)

<sup>++</sup>  $P=0,05$  u odnosu na IUZR+PE;  $P=0,002$  u odnosu na kontrolu (Mann-Whitney U-test)

#### **4.8 Povezanost broja omjera broja krvnih žila posteljičnih resica i broj resica u ispitivanim dijelovima posteljicama kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE -om i urednih trudnoća s IGF1R-om i VEGF-om**

U posteljicama kompliciranim IUZR+PE-om postoji pozitivna povezanost imunohistokemijske razine IGF1R-a, EVTb-a i VTB-a s omjerom broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica. U posteljicama urednih trudnoća postoji negativna dobra povezanost između imunohistokemijske razine IGF1R-a DC-a s omjerom broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica (Tablica 11).

Tablica 11. Prikaz Spearmanovog koeficijenta korelacije rho (p) omjera broj krvnih žila posteljičnih resica i broj posteljičnih resica s imunohistokemijskom razinom IGF1R-a u decidualnim stanicama (DC), resičnom trofoblastu (VTB), izvanresičnom trofoblastu (EVTB), krvnim žilama posteljičnih resica (KŽ), krvnim žilama *decidue basalis* (KŽDEC) posteljica trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i kontrolnim posteljicama.

	I-IUZR (n=30)	IUZR+PE (n=30)	Kontrola (n=60)
DC	-0,152 (0,211)	-0,141 (0,229)	-0,485 (0,00)
VTB	-0,047 (0,402)	0,505 (0,002)	- 0,242 (0,031)
KŽ	0,384 (0,018)	0,459 (0,005)	0,308 (0,008)
KŽDEC	-0,060 (0,377)	0,310 (0,047)	-0,051 (0,350)
EVTB	-0,263 (0,080)	0,384 (0,018)	-0,211 (0,053)

U posteljicama kompliciranim IUZR+PE-om i posteljicama urednih trudnoća ne postoji povezanost između imunohistokemijske razine VEGF-a i omjera broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica u svim ispitivanim dijelovima posteljice. Postoji slaba pozitivna povezanost između imunohistokemijske razine VEGF-a i EVTB-a posteljica kompliciranih I-IUZR-om i omjera broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica (Tablica 12).

Tablica 12. Prikaz Spearmanovog koeficijenta korelacije rho (p) omjera broja krvnih žila posteljičnih resica i broja posteljičnih resica s imunohistokemijskom razinom VEGF-a u decidualnim stanicama (DC), resičnom trofoblastu (VTB), izvanresičnom trofoblastu (EVTB), krvnim žilama posteljičnih resica (KŽ), krvnim žilama *decidue basalis* (KŽDEC) posteljica trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om i kontrolnim posteljicama.

	I-IUZR (n=30)	IUZR+PE (n=30)	Kontrola (n=60)
DC	0,098 (0,303)	0,054 (0,388)	0,011 (0,468)
VTB	-0,126 (0,254)	0,104 (0,291)	- 0,147 (0,132)
KŽ	-0,069(0,358)	0,077(0,344)	-0,115 (0,191)
KŽDEC	-0,114 (0,274)	0,195 (0,151)	0,030 (0,417)
EVTB	0,429 (0,009)	0,284 (0,064)	0,078 (0,291)



## 5. RASPRAVA

Intrauterini zastoj rasta klinički je sindrom koji se dijagnosticira kada je masa novorođenčeta ili fetusa <10. percentila za dob trudnoće korigirana prema paritetu i spolu (13). Može se očitovati kao I-IUZR-a ili može biti udružen s nekom drugom bolesti, najčešće PE-om (14). Neadekvatna pretvorba spiralnih arterija je zajednički patofiziološki mehanizam nastanka oba entiteta, a glavnu razliku čini majčin sustavni odgovor na račun endotelne disfunkcije koja se pojavljuje u PE-i (16,38). Razlog nastanka endotelne disfunkcije u nekim, ali ne i svim trudnoćama kompliciranih IUZR-om, do danas ostaje nerazjašnjen. Dosadašnja istraživanja nisu jasno odvojila navedene entitete. Objavljene studije rađene su na malom broju uzoraka, a dobiveni rezultati su neujednačeni. Pregledom dostupne literature odlučili smo istražiti imunohistokemijsku razinu nekih od bitnijih čimbenika u rastu i razvoju posteljice koji bi mogli pridonijeti razvoju ova dva sindroma. Na osnovi strogo navedenih kriterija uključenja i isključenja odvojili smo skupinu I-IUZR-a od IUZR+PE-om. Prema dosadašnjim, nama dostupnim, studijama predstavljeno istraživanje je prvi put prikazalo imunohistokemijsku razinu IGF1R-a, VEGF-a, Fas-a, FasL-a na EVTB-u, VTB-u, DC-ma, krvnim žilama *decidue basalis*, krvnim žilama posteljičnih resica, zasebno za oba sindroma, a rezultate smo usporedili s imunohistokemijskom razinom istih u posteljicama iz urednih trudnoća.

S obzirom na to da se IUZR-a pojavljuje češće u skupini ranih PE-a očekivali smo i manju dob trudnoće kod porođaja u skupini IUZR+PE u odnosu na ostale dvije ispitivane skupine (17,18). Rezultati ovog istraživanja su potvrdili da je dob trudnoće kod porođaja u skupini IUZR+PE-om značajno manja u odnosu na skupinu I-IUZR-a i kontrolnu skupinu. Time smo potvrdili da su skupine dobro formirane temeljem kriterija uključenja i isključenja. Imunohistokemijska razina IGF1R-a, VEGF-a, Fas-a, FasL-a u svim istraživanim dijelovima posteljice mijenja se s dobi trudnoće (47,52,64). Sukladno tome dobiveni rezultati na posteljicama iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om su korigirani za dob trudnoće kod porođaja. Nije dokazana razlika u dobi roditelja i paritetu između ispitivanih skupina.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su povišenu imunohistokemijsku razinu IGF1R-a u EVTB-u, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis* u posteljicama iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om u odnosu na posteljice iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om i kontrolne posteljice. Također, imunohistokemijska razina IGF1R-a bila je značajno viša u VTB-u posteljica sa I-IUZR-a u odnosu na posteljice sa IUZR+PE-om. Dosadašnja istraživanja IGF1R-a na posteljicama IUZR-a s ili bez PE-e pokazala su oprečne

rezultate. Studija Holmesa i sur. istražila je imunohistokemijsku razinu IGF1R-a u posteljicama iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om i to na sljedećim posteljičnim strukturama: stromi resica, krvnim žilama posteljičnih resica, TB-u i DC-ma. Njihova studija nije pokazala razliku u imunohistokemijskoj razini IGF1R-a u ispitivanim dijelovima posteljica I-IUZR-a u odnosu na kontrolne posteljice (48,79). Razlika u rezultatima navedene studije i ovog istraživanja najvjerojatnije proizlazi iz različitog načina određivanja imunohistokemijske razine IGF1R-a. U ovom istraživanju imunohistokemijska razina je određivana semikvantitativnom HSCORE metodom, dok su oni koristili kvalitativnu metodu određivanja intenziteta imunohistokemijskog obojenja. Također, njihova studija je ukupno imala 26 posteljica, a naša 120. Studije koje su koristile kvantitativnu molekularnu metodu PCR pokazale su povećanu koncentraciju mRNA IGF1R-a u posteljicama iz I-IUZR-a što je ujedno potvrda rezultata povišene imunohistokemijske razine IGF1R-a u našoj studiji (81,44). Prednost molekularne metode je kvantifikacija rezultata, a s druge strane je onemogućeno istraživanje zasebnih dijelova posteljice. U našem istraživanju, prema nama dostupnoj literaturi, prvi put je istražena imunohistokemijska razina IGF1R-a u EVTB-u i krvnim žilama *decidue basalis* ispitivanih skupina posteljica, stoga dobivene rezultate nismo mogli usporediti s drugim istraživanjima. Aktivacija IGF1R-a štiti stanice od apoptoze i djeluje proliferacijski (42). U endotelnim stanicama, dodatni učinak IGF1R-a je poticanje na lučenje NO-a aktivacijom eNO sintetaze. U stanjima oksidativnog stresa "up" regulacija IGF1R-a na endotelnim stanicama znači aktivaciju mehanizama zaštite u svrhu održanja endotelne stanice u inaktivnom obliku (82). Povećana imunohistokemijska razina IGF1R-a na krvnim žilama *decidue basalis* kod I-IUZR-a možda je kompenzacijski mehanizam u svrhu održanja endotelne stanice u inaktivnom obliku, a u krvnim žilama posteljičnih resica utječe indirektno na povećan transport aminokiselina i glukoze. Imunohistokemijska razina IGF1R-a na EVTB-u posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om mogla bi biti kompenzacijski mehanizam u svrhu zaštite istih stanica od apoptoze. U prilogu tome govori i negativna povezanost IGF1R-a i FasL na EVTB-u posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om.

U skladu s prethodnim istraživanjima svi istraživani dijelovi posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om kao i kontrolne posteljice pokazali su imunohistokemijsko obojenje VEGF-a (83). U našem istraživanju u DC-ma i krvnim žilama *decidue basalis* posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om imunohistokemijska razina VEGF-a bila je viša naspram posteljica kontrolne skupine, ali ne i posteljica skupine IUZR+PE. Razlika u imunohistokemijskoj razini VEGF-a u svim istraživanim dijelovima posteljice nije dokazana između posteljica iz skupine IUZR+PE i posteljica kontrolne

skupine. Prema nama dostupnoj literaturi dosadašnja istraživanja VEGF-a na posteljicama patoloških trudnoća dala su oprečne rezultate i tek se djelomično slažu s rezultatima naše studije. Barut i sur. su na posteljicama IUZR-a, koristeći imunohistokemijske metode, dokazali povišenu razinu VEGF-a u sljedećim dijelovima posteljice: stromi resica, mišićnim stanicama spiralnih arterija, endotelnim stanicama krvnih žila posteljičnih resica, CTB-u, STB-u, EVTB-u (55). Prema metodologiji rada njihova studija je najbližnja ovoj: koristili su semikvantitativnu metodu na velikom broju uzoraka, a nedostatak je nedovoljno definirani kriteriji uključenja i isključenja u studiju. Za razliku od naše studije oni su koristili selektivno protutijelo na VEGF. Ostale studije, koje su koristile imunohistokemijsku analizu VEGF-a na posteljicama IUZR-a, pokazale su nepromijenjenu imunohistokemijsku razinu VEGF-a u DC-ma i VTB-u (84,85). U našoj studiji imunohistokemijska razina VEGF-a bila je nepromijenjena u skupini IUZR+PE u odnosu na skupinu I-IUZR-a i kontrolne posteljice što se slaže i s rezultatima molekularnih studija u kojima je ukupna mRNA za VEGF bila nepromijenjena u IUZR+PE, dok su rezultati molekularne analize u posteljicama kompliciranih PE-om i/ili IUZR-om pokazali povećanu koncentraciju mRNA za VEGF (86-88). Imunohistokemijska razina VEGF-a na DC-ma posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om u našem istraživanju je povišena što može indirektno utjecati na angiogenezu posteljice. Nepromijenjena imunohistokemijska razina VEGF-a u ispitivanim dijelovima posteljica iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om i I-IUZR-om može biti posljedica korištenja protutijela VEGF-a koji veže sve izoforme VEGF-a, za razliku od gore navedene studije Baruta i sur. koji su ispitivali imunohistokemijsku razinu izoforme VEGF-A. VEGF je čimbenik rasta koji utječe na angiogenezu, a u terminskim posteljicama sudjeluje u regulaciji vaskularne permeabilnosti i vazodilatacije (49-52). Povišena imunohistokemijska razina VEGF-a u DC-ma možda parakrinim putem utječe na vazodilataciju krvnih žila *decidue basalis* i/ili na poticanje angiogeneze u posteljičnim resicama.

U svim istraživanim dijelovima posteljice I-IUZR-a, imunohistokemijska razina FasL-a bila je povišena u odnosu na posteljice iz skupine IUZR+PE i kontrolne. Rezultati prethodnih istraživanja su neujednačeni; neki su pokazali nepromijenjenu (89), neki povišenu (90), a neki sniženu (91) razinu FasL-a, dok je razina Fas-a bila nepromijenjena u posteljicama IUZR-a. U usporedbi s rezultatima prethodnih studija koja su manjkava najbližnja ovoj je ona Eide i suradnika. Njihovo istraživanje je dokazalo nižu imunohistokemijsku razinu FasL-a na DC-ma i EVTB-u posteljica trudnoća kompliciranih PE-om sa ili bez IUZR-a u odnosu na posteljice iz urednih trudnoća (91). Rezultati ove studije pokazali su nižu imunohistokemijsku razinu FasL-a u VTB-u, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis* ali

ne i u DC-ma i EVTB-u posteljica kompliciranih IUZR+PE-om. Na razliku u rezultatima između naše i njihove studije zasigurno je utjecalo, osim gore navedenog, neodvajanje skupina I-IUZR-a od IUZR+PE. Rezultati naših prethodnih istraživanja FasL na posteljicama iz PE-e su pokazala sniženu imunohistokemijsku razinu FasL na VTB-u u posteljicama kompliciranim PE-om (92). Pregledom dostupne literature naše istraživanje je prvi put predstavilo imunohistokemijsku razinu FasL-a u krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis* posebno za skupinu I-IUZR-a i IUZR+PE-om. Sukladno rezultatima drugih studija imunohistokemijska razina Fas-a nije se razlikovala u VTB-u, EVTB-u, DC-ma i krvnim žilama posteljičnih resica (93). U našoj studiji imunohistokemijska razina Fas-a bila je snižena u krvnim žilama *decidue basalis* I-IUZR-a naspram krvnih žila *decidue basalis* posteljica iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om i kontrolnoj skupini posteljica. Do sada ni jedna studija nije ispitivala imunohistokemijsku razinu Fas-a na krvnim žilama *decidue basalis* tako da je usporedba s ostalim studijama onemogućena. U posteljicama iz trudnoća kompliciranih PE-om postoji povećana infiltracija *decidue basalis* T-limfocitima, a u posteljicama IUZR-a smanjenje broja NK stanica (94,95). Studije na miševima su dokazale međudjelovanje FasL-a i T-limfocita u *decidui basalis*. Miševi, koji su defektni za funkcionalni FasL, imaju na fetomaternalnoj granici povećan broj T-limfocita (67). Istraživanje na posteljicama PE-e pokazalo je da FasL izražen na stanicama TB-a ima glavnu ulogu u eliminaciji Fas pozitivnih T-limfocita (93,94). Povišena imunohistokemijska razina FasL-a u posteljicama iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om može biti odgovor na povećanu infiltraciju upalnim stanicama koja kod IUZR+PE izostaje, što pokazuje i snižena imunohistokemijska razina FasL-a u posteljicama IUZR+PE.

Oštećen razvoj posteljice koji prati I-IUZR i IUZR+PE posljedica je kronične uteroplacentarne hipoksije (6,16,37). Rezultati naše studije pokazali su značajnu disregulaciju IGF1R-a, VEGF-a, Fas-a i FasL-a u posteljicama I-IUZR-a i IUZR+PE-om, a najveću u krvnim žilama *decidue basalis*. Na osnovi toga pokušali smo istražiti mogući utjecaj ispitivanih čimbenika na razvoj ova dva sindroma. Nemogućnost "up" regulacije IGF1R-a u krvnim žilama *decidue basalis* u IUZR+PE je mogući uzrok aktivacije endotela koji za posljedicu ima oštećenu sintezu NO i povećanu infiltraciju upalnih stanica u krvne žile. Oštećena vazodilatacija putem NO povisuje stupanj hipoksije koji je već prisutan u posteljici (37,38). Rajakumar i sur. su u svojoj studiji pokazali da postoji razlika u stupnju hipoksije: u IUZR-a nema aktivacije HIF gena za razliku od PE-e (96). Isto to potvrđuju i patohistološke analize tkiva posteljice u I-IUZR-a i IUZR+PE-om. Akutna ateroza, fibromuskularna hiperplazija krvnih žila posteljičnih resica i obliterativni endarteritis su patohistološke

karakteristike PE-e, ali ne IUZR-a (97). Navedene patohistološke promjene krvnih žila posljedica su aktivacije endotelnih stanica s posljedičnom ekstravazacijom upalnih stanica u *decidua basalis* (30,96). Dokazano je u eksperimentalnim modelima da pretjerana imunohistokemijska razina FasL-a sprječava ekstravazaciju upalnih stanica koja je posredovana TNF- $\alpha$  (98). Iako je u *decidua basalis* prisutna upala, DC-e i EVTB posteljica IUZR+PE-om nemaju povišenu imunohistokemijsku razinu FasL-a u svrhu zaštite od povećane infiltracije upalnih stanica. U posteljicama I-IUZR-a povišena imunohistokemijska razina FasL-a na DC-ma i EVTB-u upućivala bi na aktivaciju protuupalnog odgovora. Na EVTB-u posteljica I-IUZR-a imunohistokemijske razine IGF1R-a i FasL-a pokazuju negativnu povezanost čime se potvrđuje antiapoptotsko djelovanje IGF osi, a upućuje nas da je EVTB, kao modulator fetomaternalnog odgovora, višestruko zaštićen.

Promjene u razvoju korionskih resica kao posljedica hipoksije mogu ići u dva smjera: a) produljeno djelovanje procesa granajuće angiogeneze uzrokuje dominaciju nezrelih intermedijarnih resica u posteljici što vodi u nedovoljnu reapsorpciju hranjivih tvari fetusa, a posteljica je sklona hiperoksičnim oštećenjima, b) prelazak granajuće u negranajuću angiogenezu prije 23. tjedna uzrokuje prijevremenu dominaciju zrelih intermedijarnih resica, posljedica čega je posteljica sklona hipoksičnim oštećenjima (1,2,6-9). Da nastaju promjene u korionskim resicama, dokazali su i rezultati našeg istraživanja. Broj resica i broj krvnih žila posteljičnih resica bio je značajno veći u skupini I-IUZR-a u odnosu na broj istih u posteljicama IUZR+PE-om i kontrolne skupine. Omjer krvnih žila posteljičnih resica i broja resica je bio jednak između ispitivanih skupina. U svim ispitivanim skupinama dokazana je povezanost imunohistokemijske razine IGF1R-a krvnih žila posteljičnih resica s omjerom broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica. U posteljicama kompliciranim IUZR+PE-om imunohistokemijska razina IGF1R-a VTB-a i EVTB-a je pozitivno povezana s omjerom krvnih žila posteljičnih resica i broja resica dok je u posteljicama urednih trudnoća imunohistokemijska razina IGF1R-a DC-a pokazala negativnu povezanost. Prethodno navedeni rezultat upućuje na disregulaciju IGF1R-a u posteljicama kompliciranim I-IUZR-om i IUZR+PE-om.

VTB kao sastavni dio korionskih resica direktno je izložen ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi koja nastaje kao posljedica kronične uteroplacentarne ishemije (37,78). Dokazano je u prethodnim istraživanjima da je u posteljicama PE povećan broj SČ što upućuje na povećanu apoptozu u istim posteljicama (4,78). Posteljice komplicirane I-IUZR-om nisu pokazale povećan broj SČ-a (98). U prethodnim studijama nije dokazana povezanost apoptoze u VTB posteljica PE s Fas/FasL sustavom (92). Snižena razina FasL-a na VTB-u u posteljicama

IUZR+PE-om i povišena u posteljicama I-IUZR-a, dokazana u našoj studiji, potvrđuje prethodne rezultate. Povećano nakupljanje upalnih stanica uzrokovano disfunkcijom Fas/FasL sustava vjerojatno je jedan od uzročnika apoptoze TB-a.

Angiogeneza je sastavni dio diferencijacije korionskih resica te je kao takva također oštećena u stanjima kronične uteroplacentarne hipoksije (9). Broj krvnih žila posteljičnih resica je u ovom istraživanju bio značajno veći u skupni I-IUZR-a, a njihov omjer s brojem resica je pokazao pozitivnu povezanost s imunohistokemijskom razinom VEGF-a u EVTB-u. U preostale dvije skupine nije dokazana povezanost imunohistokemijske razine VEGF-a ispitivanih dijelova posteljice s omjerom broja krvnih žila posteljičnih krvnih žila i broja resica. U posteljicama trećeg tromjesečja urednih trudnoća VEGF nema glavnu ulogu na angiogenezu u posteljici (9,51,52). Naspram rezultatima prethodnih istraživanja na posteljicama I-IUZR-a i IUZR+PE-om, pokazali smo da je razina VEGF-a viša u DC-ma posteljica kompliciranih I-IUZR-om. Isto bi indirektno moglo upućivati na produljeno djelovanje VEGF-a koje za posljedicu ima produljenu fazu granajuće angiogeneze (87,88). Posteljične resice nastale kao faza produljene angiogeneze su nezrele s TB-om koji je zadebljan. Tada je prijenos hranjivih tvari i kisika otežan, a sama posteljica se nalazi u hiperoksiji, dok je fetus u hipoksiji (2,6,92,100). Krvne žile posteljičnih resica u I-IUZR-u pokazuju tzv. "up" regulaciju IGF1R-a i FasL-a. "Up" regulacija IGF1R-a je možebitni odgovor na povećanu angiogenezu u posteljicama I-IUZR-a.

Rezultati naše studije upućuju da se u posteljicama iz skupine I-IUZR-a aktiviraju mehanizmi obrane od oštećenja uzrokovanog hipoksijom, za razliku od posteljica iz trudnoća kompliciranih PE-om kod kojih izostaju. Aktivirajući mehanizme obrane pokušavaju nadoknaditi oštećenja nastala u početnoj fazi trudnoće zaostajući u razvoju u odnosu na posteljice iz urednih trudnoća. Kao takve rade smanjenim kapacitetom i nisu sposobne pratiti sve veće potrebe fetusa. U odnosu na njih, posteljice iz IUZR+PE-om pokušavaju ubrzati razvojni put u nemogućnosti aktivacije obrambenih mehanizama, time podižući upalni odgovor koji je prisutan i u urednoj trudnoći. Poznato je da su metabolički sindrom i svi njegovi dijelovi sami za sebe predisponirajući čimbenik za PE-u. Endotelne stanice su već tada u aktivnom obliku i vjerojatno se ne mogu zaštititi od daljnjeg oštećenja. Mehanizam kojim trudnoća ne dopušta odbacivanje fetusa od strane majčinog imunološkog sustava je uspostava ravnoteže između ova dva sustava. Istraživanja su pokazala da je povećan izražaj FasL-a na alogeničnom transplantatu povezan s upalom, aktivacijom neutrofila i odbacivanjem transplantata (98). Povećan izražaj FasL-a u I-IUZR-u u svim dijelovima posteljice u ovoj studiji moguće da nije samo kompenzatorni mehanizam posteljice; možda je

konstitucijski te može biti povezan s kroničnim odbacivanjem fetusa. Disregulacija Fas/FasL-a i IGF1R-a na krvnim žilama *decidue basalis*, koja može biti konstitucijska ili reaktivna mogući je potencijalni čimbenik koji određuje nastanak I-IUZR-a ili IUZR+PE-om. Ostaje otvorena mogućnost i uloge Fas/FasL sustava kao i IGF osi u razvoju majčine simptomatologije. Dokazi da posteljice ova dva sindroma imaju dva različita smjera razvoja otvara mogućnost novih kliničkih istraživanja u području doplerske ultrazvučne dijagnostike. Potencijalni nedostaci naše studije su korištenje samo jedne metode (imunohistokemijske) za određivanje razine izražaja ispitivanih protutijela te ne izdvajanje SGA fetusa unutar skupine I-IUZR-a. Iako je korištenje imunohistokemije kvalitativna metoda, primjenom HSCORE načina procjene imunohistokemijske razine protutijela, može se približiti kvantitativnoj metodi te na taj način smanjiti mogućnost subjektivne pogreške. Ispitivanje pojedinih segmenata posteljičnog tkiva kao zasebnih cjelina na istom uzorku nemoguće je bez imunohistokemije, koja u ovakvoj vrsti istraživanja postaje nadređena složenijim metodama kao što su Western blot ili PCR.

Nove studije su pokazale da patofiziologija nastanka kao i klinička prezentacija SGA nije ista kao IUZR-a. Nakon uvida u rezultate naše studije na skupini fetusa s IUZR-om, a bez patoloških protoka ne smijemo razmišljati kao o fetusima koji nisu postigli svoj potencijal rasta s urednim protocima bez hipoksije. Njihova posteljica radi na "rezervi". U kliničkoj praksi to bi značilo da su, bez obzira na uredne protoke, njihove rezerve male i svaki najmanji inzult će ostaviti posljedice. Sva dosadašnja mjerenja funkcije posteljice su putem indirektnih pokazatelja. Ostaje otvoren prostor za istraživanja kako mjeriti funkciju posteljice i to primijeniti u kliničkoj praksi.

## 6. ZAKLJUČAK

1. U posteljicama iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-a dobivena je statistički značajno viša imunohistokemijska razina IGF1R-a u EVTB-u, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis* u odnosu na iste dijelove posteljica iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om i kontrolne skupine posteljica.
2. Određivanjem imunohistokemijske razine VEGF-a u posteljicama ispitivanih skupina dokazana je statistički značajno viša imunohistokemijska razina VEGF-a u DC-ma i krvnim žilama *decidue basalis* posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-a u odnosu na kontrolnu skupinu posteljica. U posteljicama IUZR+PE-om imunohistokemijska razina VEGF-a bila je nepromijenjena u odnosu na posteljice I-IUZR-a i kontrolnu skupinu posteljica.
3. U krvnim žilama *decidue basalis* posteljica iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om i kontrolne skupine posteljica dokazana je statistički značajno viša imunohistokemijska razina Fas-a naprama krvnim žilama *decidue basalis* posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om.
4. U posteljicama iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-a imunohistokemijska razina FasL-a je statistički značajno viša u VTB-u, EVTB-u, DC-ma, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis* nego u posteljicama trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om i kontrolnim posteljicama. Posteljice IUZR+PE-om imale su statistički značajno nižu imunohistokemijsku razinu FasL-a u VTB-u, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis* naprama kontrolnoj skupini posteljica.
5. Broj resica i broj krvnih žila posteljičnih resica u posteljicama iz skupine I-IUZR-a značajno je veći u odnosu na broj krvnih žila posteljičnih resica i broj resica u posteljicama iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om i kontrolnoj skupini posteljica, dok je omjer broja krvnih žila posteljice i broja posteljičnih resica ostao nepromijenjen u svim ispitivanim posteljicama. Posteljice komplicirane IUZR+PE-om pokazuju pozitivnu povezanost imunohistokemijske razine IGF1R-a, EVTB-a i VTB-a s omjerom broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica. U posteljicama kompliciranih I-IUZR-om postoji slaba pozitivna povezanost između imunohistokemijske razine VEGF-a EVTB-a i omjera broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica. Također u posteljicama kompliciranih I-IUZR-om postoji značajna negativna povezanost IGF1R-a i FasL-a u EVTB-u.



## 7. SAŽETAK

**Uvod:** Intrauterini zastoj rasta (IUZR) je klinički sindrom. Može se prezentirati sam ili udružen s drugim bolestima, najčešće s preeklampsijom (PE). U intrauterinom zastoju rasta udruženom s preeklampsijom (IUZR+PE), osim nedostatne funkcije posteljice, prisutna je i majčina simptomatologija kao posljedica endotelne disfunkcije. Kronična uteroplacentarna ishemija prisutna u IUZR-a narušava proces rasta i razvoja posteljice. Receptor inzulinu sličnog čimbenika rasta-1 (IGF1R), vaskularni čimbenik rasta (VEGF), Fas i FasL su čimbenici koji sudjeluju u rastu i razvoju posteljice. Istraživanje imunohistokemijske razine gore navedenih čimbenika može nam pomoći u rasvjetljavanju razlika između idiopatskog intrauterinog zastoja rasta (I-IUZR) i IUZR+PE-om. Dosadašnja istraživanja nisu odvajala I-IUZR-a i IUZR+PE-om.

**Cilj:** Cilj je bio ispitati imunohistokemijsku razinu IGF1R-a, VEGF-a, Fas-a i FasL-a u decidualnim stanicama (DC), resičnom trofoblastu (VTB), izvanresičnom trofoblastu (EVTB), krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis* u posteljicama iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, IUZR+PE-om te posteljicama kontrolne skupine. Dodatni ciljevi su bili ispitati broj resica, broj krvnih žila posteljičnih resica i omjer broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica u ispitivanim posteljicama; ispitati povezanost IGF1R-a s FasL-om u ispitivanim dijelovima posteljica u skupini I-IUZR, IUZR+PE i kontrolnoj skupini; ispitati povezanost IGF1R-a i VEGF-a s brojem krvnih žila, brojem resica i omjerom broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica u posteljicama I-IUZR-a, IUZR+PE-om i kontrolnim posteljicama.

**Materijal i metode:** Istraživanje je uključivalo 30 posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, 30 posteljica iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om i 60 posteljica iz urednih trudnoća. Klinička dijagnoza IUZR-a postavljena je kada je masa novorođenčeta bila <10. percentila za dob trudnoće korigirana prema paritetu i spolu, a dijagnoza PE-e prema strogim kriterijima za arterijsku hipertenziju i proteinuriju. Upotrebom specifičnih protutijela za IGF1R, VEGF, Fas i FasL određivana je imunohistokemijska razina istih semikvantitativnom HSCORE metodom. CD31 je korišten kao biljeg endotelnih stanica. Broj resica i broj krvnih žila posteljičnih resica određivan je pomoću Olympus BX 41 mikroskopa i Olympus Cell D1 analizatora slike u svakom uzorku posteljice na 10 vidnih polja.

**Rezultati:** Dob trudnoće kod porođaja u skupini IUZR+PE bila je značajno manja u odnosu na dob trudnoće u skupini I-IUZR-a i kontrolnu skupinu. Pronađena je statistički značajno

viša imunohistokemijska razina IGF1R-a u EVTB-u, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis* posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om nego u skupini posteljica iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om i kontrolnoj skupini posteljica. U VTB-u posteljica I-IUZR-a postojala je statistički značajno viša imunohistokemijska razina IGF1R-a naprama VTB posteljica iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om. Imunohistokemijska razina VEGF-a viša je u DC i krvnim žilama *decidue basalis* iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, nego u posteljicama kontrolne skupine. Imunohistokemijska razina Fas-a je u krvnim žilama *decidue basalis* posteljica kontrolne skupine statistički značajno viša nego u posteljicama iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om. Imunohistokemijska razina FasL-a statistički je značajno viša u DC-ma, VTB-u, EVTB-u, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis* u posteljicama iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om, nego u posteljicama trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om. U DC-ma, VTB-u i krvnim žilama posteljičnih resica posteljica iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om imunohistokemijska razina FasL-a bila je niža nego u skupini I-IUZR-a i kontrolnoj skupini posteljica. Posteljice I-IUZR-a imaju statistički značajno veći broj krvnih žila posteljice i broj resica nego posteljice iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om i kontrolne skupine posteljica. Omjer broja krvnih žila posteljičnih resica i broja posteljičnih resica jednak je u svim ispitivanim posteljicama. Postoji slaba negativna povezanost između imunohistokemijske razine IGF1R-a i FasL-a EVTB-a posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om. Postoji slaba pozitivna povezanost između IGF1R-a EVTB-a i VTB-a s omjerom broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica u posteljicama trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om. U urednim trudnoćama postoji slaba pozitivna povezanost između IGF1R-a DC-a i omjera broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica. Postoji slaba pozitivna povezanost između imunohistokemijske razine VEGF-a EVTB-a posteljica kompliciranih I-IUZR-om i omjera broja krvnih žila posteljičnih resica i broja resica.

**Zaključak:** Rezultati ove studije pokazuju značajnu razliku u imunohistokemijskoj razini IGF1R-a, VEGF-a, FasL-a i Fas-a u ispitivanim dijelovima posteljica iz trudnoća kompliciranih I-IUZR-om u odnosu na posteljice komplicirane IUZR+PE-om i posteljice urednih trudnoća. Za razliku od posteljica I-IUZR-a, posteljice iz trudnoća kompliciranih IUZR+PE-om pokazuju samo promjenu u imunohistokemijskoj razini FasL-a i to na VTB-u, krvnim žilama posteljičnih resica i krvnim žilama *decidue basalis*. Gore navedno upućuje nas da posteljice I-IUZR-a aktiviraju mehanizme zaštite u svrhu smanjivanja hipoksičnog oštećenja posteljice i sprječavanja aktivacije endotelnih stanica.

## 8. SUMMARY

**Introduction:** Intrauterine growth retardation (IUGR) is a clinical syndrome. It can be presented isolated also known as Idiopathic intrauterine growth retardation (I-IUGR) or in association with other diseases, most frequently with pre-eclampsia (IUGR+PE). Chronic uteroplacental ischemia present in I-IUGR, as well as in IUGR+PE is responsible for disturbed placental growth and development. IUGR+PE is also presented with endothelial dysfunction, responsible for maternal symptoms. Insulin growth factor receptor 1 (IGF1R), vascular endothelial growth factor (VEGF), Fas and FasL are factors involved in placental growth and development. Immunohistochemical expression studies of these factors could help us to enlight the differences between I-IUGR and IUGR+PE. So far none of the researches have distinguished these entities.

**Aim:** Aim of the study was to investigate immunohistochemical expression of IGF1R, VEGF, Fas and FasL in decidual cells (DC), villous trophoblast (VTB), extravillous trophoblast (EVTB), blood vessels of the chorionic villi and *decidua basalis* in placentas from I-IUGR, IUGR+PE and placentas from normal pregnancies and to compare them. Additional aim was to determine number of villi, number of blood vessels of chorionic villi and number of blood vessels per villi in placentas included in the study and to compare them. We wanted to determine the correlation between IGF1R and FasL in studied placental segments for all placental groups. Likewise, we set to investigate the correlation of IGF1R and VEGF with number of villi, number of blood vessels of chorionic villi and number of blood vessels per villi in placentas included in the study.

**Materials and methods:** Investigation included 30 placentas from pregnancies complicated by I-IUGR, 30 placentas from pregnancies complicated by IUGR+PE, and 60 placentas from normal pregnancies. Clinical diagnosis of IUGR was made when birth mass of newborn was < 10. percentile for the pregnancy age, corrected for sex and parity, and diagnosis of PE was made under strict criteria for arterial hypertension and proteinuria. Immunohistochemical expression of IGF1R, VEGF, Fas and FasL was determined by HSCORE method using specific antibodies. CD31 was used as an endothelial cells marker. Number of villi and number of blood vessels of chorionic villi was determined with the use of Olympus BX41 microscope and Olympus Cell D1 image analyser in each placental sample per 10 fields of view.

**Results:** Pregnancy age was significantly lower in IUGR+PE group compared to I-IUGR group and controls. Immunohistochemical expression of IGF1R in EVTB, blood vessels of

chorionic villi and blood vessels of *decidua basalis* was significantly elevated in I-IUGR group compared to placentas from pregnancies complicated with IUGR+PE and controls. Immunohistochemical expression of IGF1R was significantly higher in VTB from I-IUGR placentas compared to IUGR+PE placentas. Immunohistochemical expression of VEGF was significantly higher in DC and blood vessels of *decidua basalis* in I-IUGR compared to placentas from normal pregnancies. Immunohistochemical expression of Fas in blood vessels of *decidua basalis* in placentas from control group was significantly higher than in I-IUGR and IUGR+PE placentas. Immunohistochemical expression of FasL was significantly higher in DC, VTB, EVTB, chorionic villi blood vessels, blood vessels of decidua basalis in I-IUGR placentas compared to IUGR+PE placentas and placentas from control group. FasL immunohistochemical expression was significantly lower in DC, VTB and chorionic villi blood vessels from IUGR+PE placentas than in placentas from I-IUGR and normal pregnancies. In placentas from I-IUGR group there was significantly higher number of chorionic villi blood vessels compared to IUGR+PE and control placentas, while there was no difference in the ratio between the number of chorionic villi blood vessels and number of chorionic villi in all investigated placental groups. There is a weak negative correlation between immunohistochemical expression of IGF1R and FasL on EVTB in I-IUGR placentas. There was a weak positive correlation between immunohistochemical expression of IGF1R on EVTB and VTB and ratio of blood vessels/number of chorionic villi in placentas complicated with IUGR+PE. Weak positive correlation was determined between immunohistochemical expression VEGF on EVTB and ratio of blood vessels/number of chorionic villi in placentas complicated with I-IUGR. Placentas from normal pregnancies show weak positive correlation between IGF1R on DC with ratio of blood vessels/number of chorionic villi.

**Conclusion:** Results of presented study show significant difference in immunohistochemical expression of: IGF1R, VEGF, Fas and FasL in examined placental parts from I-IUGR placentas in contrast to IUGR+PE and control placentas. Unlike I-IUGR placentas, placentas from pregnancies complicated with IUGR+PE show difference in FasL immunohistochemical expression in VTB, chorionic villi blood vessels and blood vessels of *decidua basalis*. All of the above indicate that I-IUGR placentas activate protective mechanism in order to diminish placental hypoxic injury as well as endothelial cell activation.

## 9. LITERATURA

1. Fox H, Sebire NJ. Physiology of the placenta. U: Fox H, ur. Pathology of the placenta. 3. izd. Philadelphia: Saunders; 2007. str. 57-69.
2. James JL, Carter AM, Chamley LW. Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation? *Placenta* 2012;33:327-34.
3. Pötgens AJ, Schmitz U, Bose P, Versmold A, Kaufmann P, Frank HG. Mechanisms of syncytial fusion: a review. *Placenta* 2002;23:107-13.
4. Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JC. Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:29-39.
5. Huppertz B. Placental villous trophoblast: the altered balance between proliferation and apoptosis triggers pre-eclampsia. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2006;3:103-8.
6. Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;92:35-43.
7. Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* 2004;25:114-26.
8. Castelluci M, Kaufmann P. Basic structure of the villous trees. U: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. Pathology of the human placenta. 5 izd. New York: Springer Science Business Media; 2006. str. 50-99.
9. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;9:653-60.
10. Cui Y, Wang W, Dong N, Lou J, Srinivasan DK, Cheng W i sur. Role of corin in trophoblast and uterine spiral artery remodelling in pregnancy. *Nature* 2012;484:246-50.
11. Benirschke K. Microscopic survey. U: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen RN, ur. Pathology of the human placenta 5 izd. New York: Springer Science Business Media 2006. str.16-30.
12. Militello M, Pappalardo EM, Ermito S, Dinatale A, Cavaliere A, Carrara S. Obstetric management of IUGR. *J Prenat Med* 2009;3:6-9.
13. Unterscheider J, Daly S, Geary MP, Kennelly MM, McAuliffe FM, O'Donoghue K i sur. Optimizing the definition of intrauterine growth restriction: the multicenter prospective PORTO Study. *Am J Obstet Gynecol* 2013;208:290.e1-6.

14. Kurjak A. Intrauterini zastoje rasta. U: Kurjak A, Kuvačić I, Đelmiš J, ur. Porodništvo. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 351-7.
15. Carberry AE, Gordon A, Bond DM, Hyett J, Raynes-Greenow CH, Jeffery HE. Cochrane Database Syst Rev. Customised versus population-based growth charts as a screening tool for detecting small for gestational age infants in low-risk pregnant women. 2014;16:CD008549.
16. Maulik D, Frances Evans J, Ragolia L. Fetal growth restriction: pathogenic mechanisms. Clin Obstet Gynecol 2006;49:219-27.
17. Witlin AG, Saade GR, Mattar F, Sibai BM. Predictors of neonatal outcome in women with severe preeclampsia or eclampsia between 24 and 33 weeks' gestation. Am J Obstet Gynecol 2000;182:607-11.
18. Mitani M, Matsuda Y, Makino Y, Akizawa Y, Ohta H. Clinical features of fetal growth restriction complicated later by preeclampsia. J Obstet Gynaecol Res 2009;35:882-7.
19. Aditya I, Tat V, Sawana A, Mohamed A, Tuffner R, Mondal T. Use of Doppler velocimetry in diagnosis and prognosis of intrauterine growth restriction (IUGR): A Review. J Neonatal Perinatal Med 2016;9:117-26.
20. Lausman A, McCahrthy FP, Walker M, Kingdom J. Screening, diagnosis, and management of intrauterine growth restriction. J Obstet Gynaecol Can 2012;34:17-28.
21. Lausman A, Kingdom J; Maternal Fetal Committee. Intrauterine growth restriction: screening, diagnosis and management. J Obstet Gynaecol Can 2013;35:741-8.
22. Sharma D, Farahbakhsh N, Shastri S, Sharma P. Intrauterine growth restriction part 2. J Matern Fetal Neonatal Med 2016;29:4037-48.
23. Jensen RB, Chellakooty M, Vielwerth S, Vaag A, Larsen T, Greisen G i sur. Intrauterine growth retardation and consequences for endocrine and cardiovascular diseases in adult life: does insulin-like growth factor-I play a role? Horm Res 2003;60:136-48.
24. American College of Obstetricians and Gynecologists, Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. Obstet Gynecol 2013;122:1122-31.
25. Tranquilli AL. Early and late-onset pre-eclampsia. Pregnancy Hypertens 2014;4:241.
26. Redman CW, Sargent IL, Staff AC. IFPA Senior Award Lecture: making sense of pre-eclampsia - two placental causes of preeclampsia? Placenta 2014;35 Suppl:S20-5.

27. Gleicher N. Why much of the pathophysiology of preeclampsia-eclampsia must be of an autoimmune nature. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:5.e1.
28. Huang SJ, Chen CP, Schatz F, Rahman M, Abrahams VM, Lockwood CJ. Preeclampsia is associated with dendritic cell recruitment into the uterine decidua. *J Pathol* 2008;214:328-36.
29. Loke YW, King A. Immunology of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000;14:827.
30. Obregon C, Kumar R, Pascual MA, Vassalli G, Golshayan. Update on Dendritic Cell-Induced Immunological and Clinical Tolerance. *Front Immunol* 2017;8:1514.
31. Dechend R, Homuth V, Wallukat G, Kreuzer J, Park JK, Theuer J i sur. AT(1) receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor. *Circulation* 2000; 101:2382.
32. Esplin MS, Fausett MB, Fraser A, Kerber R, Mineau G, Carrillo J i sur. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N Engl J Med* 2001;344:867-72.
33. Lie RT, Rasmussen S, Brunborg H, Gjessing HK, Lie-Nielsen E, Irgens LM. Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: population based study. *BMJ* 1998;316:1343-7.
34. Skjaerven R, Vatten LJ, Wilcox AJ, Ronning T, Irgens LM, Lie RT. Recurrence of pre-eclampsia across generations: exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. *BMJ* 2005;331:877.
35. Tuohy JF, James DK. Pre-eclampsia and trisomy 13. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99:891-4.
36. Lachmeijer AM, Dekker GA, Pals G, Aarnoudse JG, ten Kate LP, Arngrímsson R. Searching for preeclampsia genes: the current position. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;105:94-113.
37. Gathiram P, Moodley J. Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology. *Cardiovasc J Afr.* 2016;27:71-8.
38. Matsubara K, Matsubara Y, Hyodo S, Katayama T, Ito M. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res* 2010;36:239–247.
39. Wang Y, Walsh SW, Kay HH. Placental lipid peroxides and thromboxane are increased and prostacyclin is decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:946–9.

40. Murphy SR, Lamarca BB, Parrish M, Cockrell K, Granger JP. Control of soluble fms-like tyrosine-1 (sFlt-1) production response to placental ischemia/hypoxia: role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013;304:R130–R135.
41. Zhou Q, Qiao FY, Zhao C, Liu HY. Hypoxic trophoblast-derived sFlt-1 may contribute to endothelial dysfunction: implication for the mechanism of trophoblast-endothelial dysfunction in preeclampsia. *Cell Biol Int* 2011;35:61–6.
42. Blum G, Gazit A, Levitzki A. Substrate competitive inhibitors of IGF-1 receptor kinase. *Biochemistry* 2000;39:15705–12.
43. Forbes K, Westwood M. The IGF axis and placental function: a mini review. *Horm Res* 2008;69:129–37.
44. Abu-Amero SN, Ali Z, Bennett P, Vaughan JI, Moore GE. Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in term placentas: a comparison between normal and IUGR births. *Mol Reprod Dev* 1998;49:229–35.
45. Sferruzzi-Perri N, Owens JA, Pringle KG, Roberts CT. The neglected role of insulin-like growth factors in the maternal circulation regulating fetal growth. *J Physiol* 2011;589:7–20.
46. Díaz E, Cárdenas M, Ariza AC, Larrea F, Halhali A. Placental insulin and insulin-like growth factor I receptors in normal and preeclamptic pregnancies. *Clin Biochem* 2005;38:243–7.
47. Gurel D, Ozer E, Altunyurt S, Guclu S, Demir N. Expression of IGR-IR and VEGF and trophoblastic proliferative activity in placentas from pregnancies complicated by IUGR. *Pathol Res Pract* 2003;199:803–9.
48. Holmes R, Porter H, Newcomb P, Holly JM, Soothill P. An immunohistochemical study of type I insulin-like growth factor receptors in the placentae of pregnancies with appropriately grown or growth restricted fetuses. *Placenta* 1999;20:325–30.
49. Connolly DT. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem* 1991;47:219–23.
50. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A(164/165) and PlGF: roles in angiogenesis and arteriogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:169–75.
51. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006;312:549–60.



52. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:227–41.
53. Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:324–8.
54. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001;26:25–35.
55. Barut F, Barut A, Gun BD, Kandemir NO, Harma MI, Harma M i sur. Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis. *Diagn Pathol* 2010;5:24-31.
56. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical Progress. *Endocr Rev* 2004;25:581-611.
57. Chaouat G. Immunology of pregnancy. U: Chaouat G, ur. *Immunology of Reproduction*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1993. str. 1-17.
58. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S i sur. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* 1995;182:1777-83.
59. Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* 1999;27:62-74.
60. Runic R, Lockwood CJ, Ma Y, Dipasquale B, Guller S. Expression of Fas ligand by human cytotrophoblasts: implications in placentation and fetal survival. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3119-22.
61. Uckan D, Steele A, Cherry, Wang BY, Chamizo W, Koutsonikolis A i sur. Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. *Mol Hum Reprod* 1997;3:655-62.
62. Mor G, Gutierrez LS, Eliza M, Kahyaoglu F, Arici A. Fas-Fas ligand system-induced apoptosis in human placenta and gestational trophoblastic disease. *Am J Reprod Immunol* 1998;40:89-94.
63. Kauma SW, Huff TF, Hayes N, Nilkaeo A. Placental Fas ligand expression is a mechanism for maternal immune tolerance to the fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2188-94.

64. Ohshima K, Nakashima M, Sonoda K, Kikuchi M, Watanabe T. Expression of RCAS1 and FasL in human trophoblasts and uterine glands during pregnancy: the possible role in immune privilege. *Clin Exp Immunol* 2001;123:481-6.
65. Hammer A, Dohr G. Apoptotic nuclei within the uterine decidua of first trimester pregnancy arise from CD45 positive leukocytes. *Am J Reprod Immunol* 1999;42:88-94.
66. Tafuri A, Alferink J, Moller P, Hammerling GJ, Arnold B. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science* 1995;270:630-3.
67. Jiang SP, Vacchio MS. Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal 'allograft'. *J Immunol* 1998;160:3086-90.
68. Hunt JS, Vassmer D, Ferguson TA, Miller L. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus *J Immunol* 1997;158:4122-8.
69. Ciarmela P, Boschi S, Bloise E, Marozio L, Benedetto C, Castellucci M i sur. Polymorphisms of FAS and FAS ligand genes in preeclamptic women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*2010;148:144-6.
70. Ashton SV, Whitley GS, Dash PR, Wareing M, Crocker IP, Baker PN i sur. Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:102-8.
71. Roje D, Tadin I, Marušić J, Vulić M, Vučinović M, Branica D i sur. Porodne težine i duljine novorođenčadi u Splitu: Opravdanost razvijanja vlastitih referentnih vrijednosti za ocjenjivanje fetalnog rasta. *Gynecol Perinatol* 2005;14:66-74.
72. Bates SM, Greer IA, Middeldorp S, Veenstra DL, Prabulos AM, Vandvik PO. VTE, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9. izd. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;141:e691S-e736S.
73. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R i sur. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipidsyndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4:295-306.
74. Higgins RD, Saade G, Polin RA, Grobman WA, Buhimschi IA, Watterberg K i sur. Chorioamnionitis Workshop Participants. Evaluation and Management of Women and Newborns With a Maternal Diagnosis of Chorioamnionitis: Summary of a Workshop. *Obstet Gynecol* 2016;127:426-36.

75. Karcaaltincaba D, Calis P, Ocal N, Ozek A, Altug Inan M, Bayram M. Prevalence of gestational diabetes mellitus evaluated by universal screening with a 75-g,2-hour oral glucose tolerance test and IADPSG criteria. *Int J Gynaecol Obstet* 2017;138:148-51.
76. Rešić Karara J, Zekić Tomas S, Marušić J, Roje D, Kuzmić Prusac I. Fas and FasL expression in placentas complicated with intrauterine growth retardation with and without preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29:1154-9.
77. Tomas SZ, Roje D, Prusac IK, Tadin I, Capkun V. Morphological characteristics of placentas associated with idiopathic intrauterine growth retardation: a clinicopathologic study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;152:39-43.
78. Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. Placental apoptosis in preclampsia. *Obstet Gynecol* 2000;96:271-6.
79. Bonett DG, Price RM. Statistical inference for a linear function of medians: confidence intervals, hypothesis testing, and sample size requirements. *Psychol Methods* 2002;7:370-83.
80. Shiraishi S, Nakagawa K, Kinukawa N, Nakano H, Sueishi K. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the human placenta. *Placenta* 1996;17:111-21.
81. Iñiguez G, González C, Argandoña F, Kakariëka E, Johnson MC, Cassorla F. Expression and protein content of IGF-I and IGF-I receptor in placentas from small, adequate and large for gestational age newborns. *Horm Res Paediatr* 2010;73:320-7.
82. Bach LA. Endothelial cells and the IGF system. *J Mol Endocrinol* 2015;54:R1-13.
83. Sgambati E, Marini M, Zappoli Thyron GD, Parretti E, Mello G, Orlando C i sur. VEGF expression in the placenta from pregnancies complicated by hypertensive disorders. *BJOG* 2004;111:564-70.
84. Jackson MR, Carney EW, Lye SJ, Ritchie JW. Localization of two angiogenic growth factors (PDECGF and VEGF) in human placentae throughout gestation. *Placenta* 1994;15:341-53.
85. Jarvenpaa J, Vuoristo JT, Savolainen ER, Ukkola O, Vaskivuo T, Ryynanen M. Altered expression of angiogenesis-related placental genes in pre-eclampsia associated with intrauterine growth restriction. *Gynecol Endocrinol* 2007;23:351-5.
86. Szentpéteri I, Rab A, Kornya L, Kovács P, Joó JG. Gene expression patterns of vascular endothelial growth factor (VEGF-A) in human placenta from pregnancies with intrauterine growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013;26:984-9.

87. Gourvas V, Dalpa E, Konstantinidou A, Vrachnis N, Spandidos DA, Sifakis S. Angiogenic factors in placentas from pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Mol Med Report* 2012;6:23-7.
88. Cerdeira AS, Karumanchi SA. Angiogenic factors in preeclampsia and related disorders. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2(11). pii:a 006585
89. Hu WS, Wang ZP, Dong MY, Wang HZ. Expression of Fas and FasL in serum and placenta of preeclamptic pregnancy and its significance. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2005;34:499-502.
90. Koenig JM, Chegini N. Enhanced expression of Fas-associated proteins in decidual and trophoblastic tissues in pregnancy-induced hypertension. *Am J Reprod Immunol* 2000;44:347-9.
91. Eide IP, Isaksen C V, Salvesen KÅ, Langaas M, Günther CC, Iversen AC i sur. Fetal growth restriction is associated with reduced FasL expression by decidual cells. *J Reprod Immunol* 2007;74:7-14.
92. Prusac IK, Zekic Tomas S, Roje D. Apoptosis, proliferation and Fasligand expression in placental trophoblast from pregnancies complicated by HELLP syndrome or preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2011;90:1157-63.
93. Neale DM, Mor G. The role of Fas mediated apoptosis in preeclampsia. *J Perinat Med* 2005;33:471-7.
94. Darmochwal-Kolarz D, Saito S, Rolinski J, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Leszczynska-Gorzela B i sur. Activated T lymphocytes in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2007;58:39-45.
95. Warning JC, McCracken SA, Morris JM. A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system. *Reproduction* 2011;141:715-24
96. Rajakumar A, Michael HM, Daftary A, Jeyabalan A, Gilmour C, Conrad KP. Proteasomal activity in placentas from women with preeclampsia and intrauterine growth restriction: implications for expression of HIF-alpha proteins. *Placenta* 2008;29:290-9.
97. Kim JY, Kim YM. Acute Atherosclerosis of the Uterine Spiral Arteries: Clinicopathologic Implications. *J Pathol Transl Med* 2015;49:462-71.
98. Sata M, Luo Z, Walsh K. Fas ligand overexpression on allograft endothelium inhibits inflammatory cell infiltration and transplant-associated intimal hyperplasia. *J Immunol* 2001;166:6964-71.

99. Roje D, Zekic Tomas S, Capkun V, Marusic J, Resic J, Kuzmic Prusac I. Asymmetrical fetal growth is not associated with altered trophoblast apoptotic activity in idiopathic intrauterine growth retardation. *J Obstet Gynaecol Res* 2014;40:410-7.
100. Mayhew TM. A stereological perspective on placental morphology in normal and complicated pregnancies. *J Anat* 2009;215:77-90.

## **10. ŽIVOTOPIS**

**Ime i prezime:** Jasminka Rešić Karara

**Adresa:** Klinika za ženske bolesti i porode, KBC Split Spinčićeva 1, 21 000 Split

Tel. 021 551-455; Mob. 091 904 7230

E-mail: jasminka.resic@mefst.hr

**Rodena:** 30. 05. 1982. u Splitu

### **Obrazovanje:**

Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu (2006.)

Specijalistički ispit iz ginekologije i porodništva – KBC Zagreb (2015.)

### **Zaposlenje:**

Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Katedra za medicinsku kemiju i biokemiju (2007. 2009.)

Klinika za ženske bolesti i porode, KBC Split (2009.-)

### **Akademski stupnjevi i napredovanja:**

Završen poslijediplomski doktorski studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu, smjer „Klinička medicina utemeljena na dokazima”.

### **Sudjelovanje u nastavi:**

- od 2007: dodiplomska nastava iz predmeta Biokemija
- od 2008: nastava na kolegiju Imunokemijske metode u glikomedicini unutar poslijediplomskog studija,

### **Sudjelovanje na znanstvenoistraživačkom projektu:**

1. Znanstveni novak na projektu: "Patobiokemija glikosfingolipidnih antigena", voditeljica izv. Prof. dr. sc. Anita Markotić

### **Edukacija:**

- Područje      Tečaj za kardiopulmonalnu reanimaciju odraslih Ustanova Klinička bolnica Split
- Područje      APLS Advanced Pediatric Life Support
- Ustanova      Institut "Ruđer Bošković" Područje Tečaj iz molekularne biologije Godina 2009. Mjesto Zagreb
- Ustanova      Opća bolnica "Sveti Duh" Područje Porodničke operacije Godina 2011. Mjesto Zagreb
- Ustanova      Klinička bolnica "Sestre milosrdnice" Područje Intraportalno monitoriranje Godina 2014. Mjesto Zagreb

### **Publiciranje:**

#### **Suautor u knjigama:**

1. Rešić B, Rešić Karara J, Ursić A. Poremećaj iz autističnog spektra. U: Čulić V, Pavelić J, Radman M, ur. Genetičko informiranje u praksi. Zagreb: Medicinska naklada; 2015. str. 188-91.

### **Radovi objavljeni u CC indeksiranim časopisima:**

1. Kuzmanić-Šamija R, Rešić B, Tomasović M, Gabrić-Pandurić D, Lozić B, Lozić M, Rešić J. West syndrome with periventricular leukomalacia: ten- year clinical study. Coll Antropol 2008;32(Suppl 1):105-11.

2. Rešić B, Tomasović M, Kuzmanić–Šamija R, Lozić M, Rešić J, Solak M. Neurodevelopmental outcome in children with periventricular leukomalacia. *Coll Antropol* 2008;32 (Suppl 1):143-7.
3. Tomasović M, Rešić B, Ivelja N, Kuzmanić–Šamija R, Rešić J, Pandurić DG i sur. Glycosphingolipid expression in cerebrospinal fluid of infants with neurological abnormalities: Report of three cases. *Coll Antropol* 2008;32(Suppl 1):189-93.
4. Kovačević LM, Puizina-Ivić N, Ljutić D, Brakus SM, Govorko DK, Jeličić I i sur. Differences in epidermal thickness and expression of apoptosis regulatory proteins in the skin of patients with chronic renal failure and pruritus. *Acta Histochem* 2013;115:144-50.
5. Rešić J, Čikeš-Čulić V, Zemunik T, Markotić A. Hepatic and pancreatic glycosphingolipid phenotypes of the neurological different rat strains. *Coll Antropol* 2011;35 (Suppl 1):259- 63.
6. Marusic J, Prusac IK, Tomas SZ, Karara JR, Roje D. Expression of inflammatory cytokines in placentas from pregnancies complicated with preeclampsia and HELLP syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013;26:680-5.
7. Rešić Karara J, Zekić Tomas S, Marušić J, Roje D, Kuzmić Prusac I. Fas and FasL expression in placentas complicated with intrauterine growth retardation with and without preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29:1154-9.
8. Roje D, Zekic Tomas S, Capkun V, Marusic J, Resic J, Kuzmic Prusac I. Asymmetrical fetal growth is not associated with altered trophoblast apoptotic activity in idiopathic intrauterine growth retardation. *J Obstet Gynaecol Res* 2014;40:410-7.

**Radovi objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u drugim međunarodnim indeksnim publikacijama:**

1. Rešić B, Tomasović M, Kuzmanić–Šamija R, Rešić J, Ursić A. Ohtahara syndrome – Early infantile epileptic encephalopathy with characteristic pattern on electroencephalograph – “Suppression burst” (Ohtahara sindrom- Rana epileptička encefalopatija s karakterističnim elektroencefalografskim zapisom – “Suppression burst”). *Paediatr Croat* 2007;51:209-12.



2. Rešić B, Solak M, Rešić J, Lozić M. Attention deficit hyperactivity disorder (Poremećaj pažnje s hiperaktivnošć). Paediatr Croat 2007;51(Suppl 1):170-9.
3. Rešić B, Solak M, Rešić J, Lozić M. Pervasive developmental disorders (Pervazivni razvojni poremećaji). Paediatr Croat 2007;51(Suppl 1):159-66.

**Sažeci kongresnih priopćenja koji se indeksiraju u Current Contentsu:**

1. Kuzmanic-Samija R, Lozić B, Culić V, Resic B, Gabric-Panduric D, Tomasovic M, Resic J. Diagnosis and follow up in three cases of incontinentia pigmenti. Eur J Paediatr Neurol 2008;12 (Suppl 1):26. Program and Abstract of the International Conference on Diagnosis and Treatment in Pediatric Neurology. Warsaw.
2. Ursic A, Resic B, Resic J, Tomasovic M, Samija-Kuzmanic R. Unilateral infantile spasms. Eur J Paediatr Neurol 2008; (Suppl 1):36. Program and Abstract of the International Conference on Diagnosis and Treatment in Pediatric Neurology. Warsaw.
3. Resic J, Resic B, Tomasovic M, Kuzmanic- Samija R, Ursic A, Solak M. Non epileptic paroxysmal movement disorders in children. Eur J Paediatr Neurol 2008;12(Suppl 1):50. Program and Abstract of the International Conference on Diagnosis and Treatment in Pediatric Neurology. Warsaw.
4. Resic B, Resic J, Tomasovic M, Karabeg E, Kuzmanic-Samija R. Severe early epileptic encephalopathy. Eur J Paediatr Neurol. 7th European Pediatric Neurology Society (EPNS) Congress. Knjiga sažetaka. Izmir 2007. str. 63.
5. Rešić J, Saraga M, Košuljandić-Vukić Đ. Relationship between desmopressin therapy and osmolality of first morning urine in Primary Nocturnal Enuresis. 14th International Conference in Pediatric Nephrology. Knjiga sažetaka. Budapest 2007. str. 1535-5.

**Aktivno sudjelovanje na kongresima (posterima):**

1. Resic J, Resic B, Tomasovic M, Kuzmanic- Samija R, Ursic A, Solak M. Non epileptic paroxysmal movement disorders in children. Eur J Paediatr Neurol. Program and Abstract of

the International Conference on Diagnosis and Treatment in Pediatric Neurology. Warsaw 2008.

2. Rešić J, Saraga M, Košuljandić-Vukić Đ. Relationship between desmopressin therapy and osmolality of first morning urine. 14th International Congress of the Internationale Pediatric Nephrology Association. Budapest 2007.

3. Kuzmic Prusac I, Resic Karara J, Zekic Tomas S, Marusic J, Roje D. Fas and FasL expression in placentas complicated with intrauterine growth retardation with and without preeclampsia. 28th Congress of European Society of Pathology. Cologne 2016.

**Strani jezici:**

Engleski (aktivno); njemački (pasivno).