# Izražaj i uloga RECK proteina i IL-6 u plodovim ovojima trudnica s prijevremenim prsnućem vodenjaka u nedonošenim trudnoćama

**Benzon, Zdeslav**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:074571

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

*Repository / Repozitorij:*

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**
**MEDICINSKI FAKULTET**

**ZDESLAV BENZON**

# IZRAŽAJ I ULOGA RECK PROTEINA I IL – 6 U PLODOVIM OVOJIMA TRUDNICA S PRIJEVREMENIM PRSNUĆEM VODENJAKA U NEDONOŠENIM TRUDNOĆAMA

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2022.**

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Marko Vulić

**Zahvale**

*Od sveg srca zahvaljujem svom mentoru i pravom prijatelju izv. prof. dr. sc. Marku Vuliću, dr. med. na pomoći, podršci i beskrajnom strpljenju.*

*Doktorsku disertaciju posvećujem svojoj supruzi Sandri.*

SADRŽAJ


1. UVOD 6

1.1. PLODOVI OVOJI 6
1.1.1. Razvoj, građa i funkcija plodovih ovoja 6
1.2. KOLAGEN 8
1.3. MATRIKSMETALOPROTEINAZE 11
1.4. RECK PROTEIN 13
1.5. INTERLEUKIN 6 16
1.6. PRIJEVREMENI POROĐAJ 19
1.6.1. Definicija, incidencija i podjela 19
1.6.2. Čimbenici rizika 20
1.6.3. Početak poroda 21
1.6.4. Uzroci nastanka PP 22
1.7. KORIOAMNIONITIS *VS*. SINDROM INTRAAMNIJSKE INFEKCIJE (SIAI) 27
1.8. HISTOLOŠKI KORIOAMNIONITIS 28
1.9. PREDTERMINSKO PRIJEVREMENO PRSNUĆE PLODOVIH OVOJA 30
1.9.1. Definicija i incidencija 30
1.9.2. Dijagnoza 30
1.9.3. Podjela PPPPO 31
1.9.4. Postupak kod PPPPO-a 33
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE 35

3. ISPITANICE, MATERIJALI I METODE ISTAŽIVANJA 36

3.1. ISPITANICE I MATERIJALI ISTRAŽIVANJA 36
3.2. METODE ISTRAŽIVANJA 37
3.2.1. Patohistološki pregled plodovih ovoja 37
3.2.2. Imunohistokemijska metoda 37
3.2.3. Statističke metode 40
4. REZULTATI 41

4.1. Demografska i laboratorijska obilježja ispitivanih skupina 41
4.2. Ekspresija interleukina 6 i RECK proteina u ispitivanim skupinama 45
5. RASPRAVA 51

6. ZAKLJUČCI 60

7. SAŽETAK 61

8. SUMMARY 62

ŽIVOTOPIS 72

POPIS KRATICA

ADAMTS (eng. *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) dizintegrin i metaloproteinaze s trombospodin motivomDNK - deoksiribonukleinska kiselina
AFI - (eng. *amniotic fluid index*) indeks plodne vode AFP - alfa feto protein
BMP - (eng. *bone morphometric protein*) koštani morfometrički protein
CRH - (eng. *corticotropin releasing hormone*) kortikotropin oslobađajući hormon
CRHBP - (eng. *corticotropin-releasing hormone binding protein*) protein koji veže kortikotropin oslobađajući hormon
EGF - (eng. *epidermal growth factor*) epidermalni čimbenik rasta
fFN - (eng. *fetal fibronectin*) fetalni fibronektin
FGF - (eng. *fibroblast growth factor*) čimbenik rasta fibroblasta
F2 - Isop - F2 isoprostan
GPI - (eng. *glicosyl phosphatidil inositol*) glikozilfosfatidil inozitol
HLKNL - hidroksilizin-keto-norleucin
HNL - hidroksilizin-norleucin
IGF/IGF-BP - (eng. *insulin like growth factor - binding protein*) čimbenik rasta nalik inzulinu / vezujući protein čimbenika rasta nalik inzulinu
IHK - imunohistokemija
IL - interleukin
IL1b - interleukin 1b
IL6 - interleukin 6
IL8 - interleukin 8
IL-R6 - (eng. *soluble interleukin-6 receptor*) topivi interleukin-6 receptor
ISP - (eng. *serine protease inhibitors* - SPI) inhibitori serinske proteaze -
ITM - (eng. *Body Mass Index* - BMI) indeks tjelesne mase
JAK - janus kinaza
MAPK - (eng. *mitogen activated protein kinase*) mitogen aktivirana protein kinaza
MCP - (eng. *monocite chemoattractant protein*) monocitni kemoatratanti protein 1
MMP - matriks metaloproteinaze
NAC - N- acetilcistein
NF - kapa B - (eng. *nuclear factor kappa B*) jezgreni čimbenik kapa B

PAMG 1 - (eng. *placental alpha microglobulin-1*) posteljični alfa mikroglobulin 1

PCP - prokolagen C proteinaza

PP - prijevremeni porođaj

PPPPO - (eng. *preterm premature rupture of membranes PPROM*) predterminsko prijevremeno prsnuće plodovih ovoja

PR A, B i C - progesteronski receptor A, B i C

P-3-H - prolil-3-hidroksilaza

P38MAPK - p38 mitogenom aktivirana protein kinaza

P-4-H - prolil-4-hidroksilaza

RDS - respiratorni distres sindrom

RECK PROTEIN - (eng. *Reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motifs*)

RNK - ribonukleinska kiselina

ROS - (eng. *reactive oxygen species*) slobodni radikali kisika

SAA - (eng. *serum amiloid A*) serumski amiloid A

SERM - selektivni estrogenski receptorski modulator

SIAI - sindrom intraamnijske infekcije

SNP - (eng. *single nucleotide polymorphisms SNP*) polimorfizam pojedinačnih nukleotida

SPP - spontani prijevremeni porođaj

STAT3 - (eng. *signal transducer and activator of transcription factor 3*)

TGF – α - (eng. *transforming growth factor alpha*) transformirajući čimbenik rasta alfa

TGF β - (eng. *transforming growth factor beta*) transformirajući čimbenik rasta beta

TIMP - (eng. *tissue inhibitor matrix metalloproteinase*) tkivni inhibitori matriks metaloproteinaze

TNFα - (eng. *tumor necrotising factor alpha*) čimbenik tumorske nekroze alfa

TLR - (eng. *tool like receptor*)

VEGF - (eng. *vascular endothelial growth factor*) vaskularni endotelijalni čimbenik rasta

β HCG - beta humani korionski gonadotropin

Δ-HLNL - dehidro-hidroksilizin-norleucin

# 1. UVOD

## 1.1. PLODOVI OVOJI

### 1.1.1. Razvoj, građa i funkcija plodovih ovoja

Trudnoća započinje oplodnjom. Spajanjem spermija i jajne stanice nastaje zigota. Nakon spajanja započinje niz mitoza u zigoti kojima se povećava broj stanica u embriju. Tako nastaje morula koja migrira u materište gdje se između stanica počne nakupljati tekućina te tako nastaje blastocista (1). U fazi blastociste započinje implantacija u kojoj telomere i telomeraze pokazuju vrhunac svoje aktivnosti. Telomere su deoksiribonukleinske (DNK) strukture koje štite cjelovitost kromosoma. To rade putem *„kapica"* koje prekrivaju krajeve i bogate su gvaninom. Telomeraze su enzimi koji štite cjelovitost telomera (2–4). Pokazivanje vrhunca aktivnosti telomera i telomeraza u fazi blastociste vjerojatno određuje biološko trajanje života svih stanica podrijetla iz blastociste, pa tako i plodovih ovoja. U daljnjem tijeku trudnoće blastocista se dijeli u vanjski sloj, trofoblast, i unutarnji, embrioblast, iz kojeg će se razviti embrij. Implantacija blastociste u sekrecijski promijenjen endometrij događa se usporedo s formiranjem malih prostora u embrioblastu iz kojih će nastati plodova šupljina. Daljnje morfološke promjene u embrioblastu rezultiraju nastankom embrionalnog diska - dvoslojne tvorbe koja se sastoji od epiblasta i hipoblasta. Epiblast čini dno amnijske šupljine dok hipoblast, zajedno s egzocelomskom membranom, čini primitivnu žumanjčanu vreću. Razvoj amnija i korija počinje tijekom embriogeneze iako oni ne sudjeluju u formiranju embrija i fetusa. Rani rast i razvoj amnija i korija brz je i neovisan jedan od drugog. Do spajanja amnija i korija u jedinstvenu strukturu dolazi do navršenog 13.-15. tjedna trudnoće (1,5). Sastav plodovih ovoja i njihova sposobnost stvaranja niza biomarkera pokazuje da imaju važnu ulogu u rastu i razvoju fetusa. Stanice plodovih ovoja nastavljaju se dijeliti tijekom trudnoće, a dioba je na vrhuncu pred njenim krajem. U plodovim ovojima nalaze se i matične stanice što pokazuje da i one imaju određenu ulogu u rastu i razvoju fetusa. Kako je aktivnost telomera i telomeraza najjače izražena u fazi blastociste, tako se duljina telomera u stanicama plodovih ovoja smanjuje, od 18 kb u 22. tjednu trudnoće na 7 kb u 41. tjednu trudnoće. To pokazuje da sve sastavnice plodove šupljine stare tijekom trudnoće (2,3). Plodovi ovoji još se nazivaju i placentarne i amniokorionske membrane. Iako nastaju iz iste embrionalne osnove, razlikuju se od posteljice. Predstavljaju kontaktnu površinu, ali i barijeru, između maternice i plodove šupljine (1,6). Amnij predstavlja dio okrenut prema plodovoj šupljini dok je korij u stalnom kontaktu s deciduom. Amnij i korij su tkiva fetalnog podrijetla i važni su za početak, održavanje i kraj trudnoće. Pružaju potporu fetusu za rast i razvoj (1,7). Plodovi ovoji povezani su izvanstaničnim matriksom u kojem se nalaze

značajne količine kolagena. Ostale sastavnice izvanstaničnog matriksa su fibrozne bjelančevine: elastin, fibronektin, laminini, proteoglikani i hijaluroni. One su, pomiješane s različitim tipovima kolagena, odgovorne za mehaničku građu i čvrstoću plodovih ovoja, ali i elastičnost. Amnij je u stalnom kontaktu s plodovom vodom te je sposoban odmah reagirati na eventualne promjene u njenom sastavu i/ili temperaturi odnosno količini. Korij je u kontaktu s deciduom i vjerojatno je odgovoran za održavanje majčine imunološke tolerancije fetusa. Građen je od tri sloja, a avaskularni amnij od pet slojeva stanica. Slojevi amnija su amnijski epitel, bazalna membrana, kompaktni i spužvasti sloj te stanice fibroblasta. Iako je korij deblji, amnij se smatra odgovornim za čvrstoću plodovih ovoja. Najveći dio njegove čvrstoće dolazi iz kompaktnog sloja koji je bogat kolagenima tipa 1 i 3, dok su kolageni tipa 5, 6 i 7 manje zastupljeni. Stanično mjesto sinteze ovih kolagena još nije otkriveno. Elastin, koji se stvara iz prekursora tropoelastina, daje viskoelastična svojstva plodovim ovojima te im omogućava da se prilagođavaju rastu maternice i fetusa tijekom trudnoće. Fibronektin, laminini, proteoglikani i hijaluroni imaju važnu ulogu u građevnoj i funkcionalnoj ulozi plodovih ovoja (1,8,9).

## 1.2. KOLAGEN

Kolagen čini jednu trećinu svih bjelančevina u tijelu čovjeka. Količinski i funkcionalno najvažniji je dio izvanstaničnog matriksa te stvara strukturnu potporu za njegove stanice (10,11). Danas je poznato 28 različitih vrsta kolagena koji su građeni od najmanje 46 različitih polipeptidnih lanaca. Osnovna struktura kolagena je trostruka lijevostrana zavojnica sastavljena od tri paralelna alfa lanca čiju sintezu kontroliraju različiti geni (10–12).

Alfa lanci karakterizirani su ponavljajućim sekvencama Glicin – X – Y. Na mjestu X i Y mogu biti bilo koje amninokiseline, a najčešće je na mjestu X prolin, a na mjestu Y hidroksiprolin. Ovaj triplet rezultira nastajanjem lijevostrane zavojnice koja se isprepliće s druge dvije i pri tome tvore desnostranu zavojnicu. Aminokiselina glicin omogućava α lancima da se omotaju jedan oko drugog (10,12). Osim toga, ona omogućava stabilizaciju molekule te olakšava stvaranje vodikovih mostova i formiranje poprečnih sveza (10,11).

Pojedinačna trostruka zavojnica naziva se tropokolagen. Ova trostruka ponavljajuća sekvenca, glicin-prolin-hidroksiprolin, karakteristična je za sve kolagene, mada ponekad može izostati kao kod nefibrilarnih kolagena (10,12). Trostruka zavojnica podijeljena je u pet D segmenata pri čemu su segmenti D1-D4 dugački 67 nm, a D5 0,46 nm (10,11).

Postoji nekoliko različitih vrsta kolagena, ali za nas su najzanimljiviji fibrilarni (tipovi I, II, III, V, XXIV i XXVII) zbog njihove podložnosti djelovanju matriksmetaloproteinaza (MMP). Različita je osjetljivost raznih tipova kolagena na djelovanje raznih MMP. Tako npr. MMP1 puno učinkovitije razgrađuje tip I nego tip III kolagena, dok je tip V otporan na većinu MMP, osim MMP2 i MMP9 (10,12,13). Trostruka zavojnica može biti sastavljena od tri identična polipeptidna lanca (homotrimerna), kao u slučaju kolagena tipa II, ili od različitih lanaca (heterotrimerna), kao u slučaju kolagena tipa I i V (10,12–14). U *in vivo* uvjetima kolageni se organiziraju u više hijerarhijske strukture. Fibrilarni kolageni organiziraju se u vlakna koja su odgovorna za čvrstoću tkiva (10,12,14). Veličina ovih vlakana određena je djelovanjem kolagena tipa V koji se uvezuje s kolagenima tipa I i III te s proteoglikanima (10,12). Od ostalih kolagena neki se pridružuju ovim vlaknima, a preostali tvore mrežu u bazalnoj membrani. Neki kolageni su i transmembranske molekule (10,12). Kolageni su sastavni dio plodovih ovoja. Poznat je veliki broj molekula koje čine sastavni dio izvanstaničnog matriksa plodovih ovoja, a najbolje su proučeni fibrilarni kolageni te oni koji sudjeluju u izgradnji bazalne membrane (tipovi kolagena I, II, III, IV i V). Od ostalih bjelančevina još su proučavani fibronektin, hijaluron, biglikan kao i dekorin (10,12,14). Plodovi ovoji su viskoelastične avaskularne strukutre koje se sastoje od nekoliko različitih slojeva. Sloj koji je najbliži fetusu je amnij, a on se sastoji od epitelnih stanica

položenih na bazalnu membranu koja sadrži kolagen tipa IV i neke druge glikoproteine. Ispod bazalne membrane nalazi se kompaktni sloj građen od kolagena tipa I, III i V. Spužvasti sloj ispod njega sastoji se od proteoglikana, glikoproteina i kolagena tipa III. Ovaj sloj odvaja amnij od korija te omogućava „klizanje“ amnija po predležećem koriju. Korij se sastoji od stanica citotrofoblasta uloženih u matriks sastavljen od kolagena tipa IV i V. Taj je sloj čvrsto priljubljen uz decidualni sloje materišta (10,12). Distribuciju raznih komponenti izvanstaničnog matriksa, uključujući kolagene tipa I, III, IV,V i VI, dominantno se proučavalo imunhistokemijskim metodama. Tipovi I i III pronađeni su u većini slojeva plodovih ovoja osim u trofoblastu korija. Tip V pronađen je u retikularnom sloju, dok je tip VI, osim u retikularnom sloju, pronađen i u amniju. Mezenhimalne stanice amnija mjesto su stanične sinteze kolagena. Glasnička RNA za prokolagen α1(I), α2(I), α1(III) pronađena je u najvećoj količini u amnijskim mezenhinalnim stanicama, a tek neznatno u amnijskim epitelnim stanicama. Stoga je i sinteza kolagena tipova I i III minimalna u amnijskim epitelnim stanicama, dok se najveće količine stvaraju u mezenhimalnim stanicama. Aktivnost glasničke RNA za sintezu kolagena, kao i broj mezenhimalnih stanica amnija, tijekom trudnoće se mijenja. Razina aktivnosti podjedinica glasničke RNK prokolagena α1(I), α2(I) i α1(III) najsnažnija je u ranoj trudnoći, a počinje opadati između 12. i 14. tjedna na razine na kojima ostaje do termina porođaja. Gustoća i broj mezenhinalnih stanica u amniju trudnica također opada nakon prvog tromjesečja. Porast u omjeru epitelnih i mezenhimalnih stanica napredovanjem trudnoće reflektira smanjenje glasničke RNK za kolagen i specifičniu aktivnost lizila i prolil hidroksilaza u amniju (10–12).

Sinteza kolagena odvija se u nekoliko faza. Glasnička RNK prepisuje se u ribosomu formirajući pre-polipeptid. Sljedeće tri faze odvijaju se u endoplazmatskom retikulu; odvajanje N terminalne sekvence, hidroksilacija lizina i prolina i konačno glikozilacija lizina što rezultira stvaranjem prokolagena. U sljedećoj se fazi djelovanjem kolagen peptidaza (odvajanje odmotanog dijela prokolagena) stvara tropokolagen. Mikrofibrilarni kolagen stvara se djelovanjem lizil oksidaze koja grupira zajedno 5 tropokolagenskih lanaca (11).

Poznato je da u plodovim ovojima postoje zone potpuno promijenjene morfologije karakterizirane slabljenjem vezivnog tkiva. Ove promjene vjerojatno nastaju kao posljedica pojačane regionalne apoptoze trofoblasta te stanjenjem ili nestankom decidue u slučaju predterminskog prijevremenog prsnuća podovih ovoja (PPPPO). U terminskim trudnoćama ove se promjene viđaju u dijelu plodovih ovoja koji se nalaze iznad unutarnjeg ušća maternice. U tim dijelovima plodovi ovoji imaju samo 60% čvrstoće u odnosu na one smještene proksimalnije, prema korpusu i fundusu uterusa. Gubitak strukturne organizacije vezivnog tkiva očituje se u povećanom razmaku između fibrila i 50% smanjenjem uvezanosti. U ovim zonama pojačana je i aktivnost MMP9, NF-kB,

polimeraze 1, Fox 03 i Fox 04, i smanjenje aktivnosti tkivnih inhibitora matriksmetaloproteinaze 3 (TIMP3) te se vide histološke značajke povezane s pojačanom pregradnjom vezivnog tkiva i staničnom apoptozom (12).

## 1.3. MATRIKSMETALOPROTEINAZE

Metzincin je obitelj multidomenskih cink ovisnih endopeptidaza koje uključuju i matriksmetaloproteinaze (MMP). Prvi put opisane su 1949. godine kao depolimerizirajući enzim koji olakšava rast tumora i to na način da stromu vezivnog tkiva, uključujući i male krvne žile, čini mekšim (11,15). Danas smo sigurni da su MMP prisutne u virusima, bakterijama, nekim biljkama kao i u nekih životinja (11,16). MMP je obitelj proteolitičkih enzima koji imaju različite supstrate, ali i vrlo slične strukturne značajke (11,17). Aktivno mjesto ovisno je o cinku i jako je, evolucijski gledano, sačuvano (15,17). Sastoji se od tri histidinske rezidue vezane za katalitički cink. Najbolje djelovanje MMP ostvaruju u sredinama s neutralnim pH. Odnedavno se koriste kao biomarkeri u različitim područjima biomedicine poput dijagnosticiranja, nadzora te procjene učinkovitosti liječenja (16,18). Glavna biološka funkcija MMP je razgradnja bjelančevina izvanstaničnog matriksa, glikoproteina, membranskih receptora, citokina i raznih činitelja rasta (17,18). Uključene su u mnoge biološke procese poput obnove i remodeliranja tkiva, diferencijacije stanica, embriogeneze, morfogeneze, pokretljivosti i proliferacije stanica, angiogeneze, zarastanja rana, apoptoze, ovulacije i proliferacije endometrija (11,16,17). Disregulacija aktivnosti MMP može dovesti do niza patoloških stanja koja se mogu grupirati u tri skupine: razgradnja tkiva, slabljenje matriksa i fibroza. U kralježnjaka postoji 28 raznih vrsta MMP, od kojih najmanje 23 pokazuju aktivnost u ljudskom tkivu. Postoji podjela matriksmetaloproteinaza, temeljem bioinformatičke analize, u pet skupina (11,17,19). Puno jasnija je podjela temeljem specifičnosti prema supstratu. Na ovaj način se dijele u kolagenaze, gelatinaze, stromelizine, metrilizine, membranski tip MMP i ostale MMP (11,15–17,19) Kolagenaze (MMP1, 8 13 i 18) razgrađuju bjelančevine izvanstaničnog matriksa i neke druge topive bjelančevine. Ipak, njihova najvažnija uloga jest razgradnja fibrilarnih kolagena tipa I, II, III, IV i XI u dvije karakteristične cjeline tj. fragmenta; ¼ C terminalnu domenu i ¾ N terminalnu domenu. Proces se odvija u dva akta. Najprije MMP razmotaju strukturu trostruke zavojnice, a nakon toga dolazi do razgradnje proteinskih sveza. Gelatinaze (MMP2 i 9) razgrađuju kolagene tipa IV, V, VIII, X i XI kao i neke druge sastavnice vezivnog tkiva. MMP2 je primarno gelatinaza. Može djelovati i kao kolagenaza, ali slabije učinkovitosti. MMP9 može djelovati kao kolagenaza, ali i kao gelatinaza. MMP2 razgrađuje kolagen u dva koraka. Najprije dolazi do aktivnosti koja nalikuje slaboj aktivnosti kolegenaza, a nakon toga počne djelovati promovirajući gelatinolizu koristeći domenu poput fibronektina (11,15–18).

Struktura raznih MMP nije jedinstvena. Najčešće strukturne sastavnice MMP su signalni N terminalni peptid, pro domena, katalitička domena, vezna regija, domena poput hemopeksina i dodatna transmembranksa domena. Pri tome treba reći da su samo prve tri (signalni peptid, pro domena te katalitička domena) prisutne u svim MMP. Strukturna sličnost katalitičke domene varira od 33 do 86% između različitih MMP. Sve MMP stvaraju se s N terminalnom sekvencom (inaktivni oblik) koji se u endoplazmatskom retikulu odstranjuje, stvarajući pro enzim. Aktivno mjesto sastoji se od dva područja; specifičnog S1 mjesta i udubljenja na površini proteina unutar kojeg se u središtu nalazi cink (11,15–17).

Izražajnost MMP čvrsto je regulirana transkripcijom, sekrecijom, aktivacijom i inhibicijom aktiviranog enzima. MMP stvaraju razna tkiva i stanice, poput proupalnih stanica, ali i uteroplacentarnih, poput fibroiblasta, citotrofoblasta, limfocita, makrofaga i neutrofila (11,15–17). MMP se luče u formi zimogena koji se proteolitički aktivira u izvanstaničnom prostoru (11,15,16).

Dobro je poznata uloga MMP u mehanizmu ročnog, ali i prijevremenog porođaja, pogotovo u njegovoj inačici PPPPO uz dokazani korioamnionitis (5,20,21).

## 1.4. RECK PROTEIN

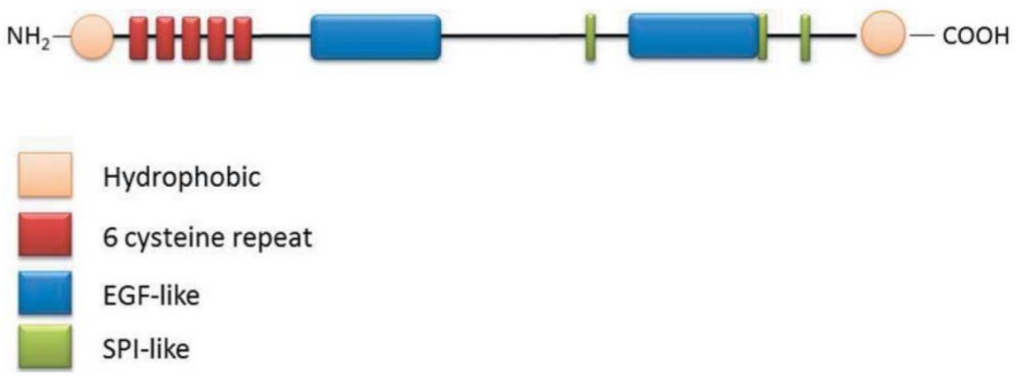
RECK protein (eng. *Reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motifs*) membranski je glikoprotein koji je prisutan u svim stanicama sisavaca, a njegova glasnička RNA nalazi se u nizu ljudskih organa kao i kulturama stanica proizašlih iz njih (22). Ljudski RECK gen lociran je na kromosomskoj regiji 9p13-p12. Zanimljivo je da je još nekoliko tumor supresorskih gena smješteno u ovoj kromosomskoj regiji, poput *p16INK4A* koji igra važnu uloga u razvoju melanoma (22,23). Njegova je glavna uloga sudjelovanje u remodeliranju veziva kontrolirajući aktivnost enzima uključenih u pregradnju tog tkiva, prvenstveno MMP tj. MMP9. Ova značajka je u fiziološkim stanjima najviše izražena u procesu cijeljenja rane. Aktivnost RECK također je povezana s različitim oblicima raka. Gen koji kontrolira sintezu RECK proteina izoliran je kao supresor gen koji spriječava invaziju i metastaziranje tumora utječući na funkciju MMP9. Nalazi se u svim tkivima, ali ga nije moguće otkriti u mnoštvu tumora ili u kulturama fibroblasta koje su transformirane različitim onkogenima (24,25). Ljudski RECK gen proteže se preko regije dugačke 87kb i sadrži 21 egzon i 20 introna s 13 polimorfizama pojedinačnih nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphisms* - SNP). Četiri SNP su dokazani u kodirajućoj regiji gena (egzoni 1, 9, 13 i 15), a preostalih 9 su u intronima 5, 8, 10, 12, 15 i 17. Polimorfizam SNP u kodirajućoj regiji može dovesti do sinteze RECK proteina poremećene funkcije. U miševa je dokazan visoko homologni gen smješten na kromosomu 4 koji se sastoji od 19 egzona i 18 introna. Ipak, čini se da je RECK gen visoko konzerviran tijekom evolucije. RECK gen sačuvan je i u čimpanza, Rezus majmuna, krava, nekih glodavaca, kokoši i komaraca (22,25,26).

U vrste *Xenopus laevis* ekspresija RECK gena bila je niska tijekom gastrulacije, ali je povećana tijekom neurulacije i organogeneze. Nadalje, RECK je bio lokaliziran na prednjoj i dorzalnoj strani embrija u razvoju (23).

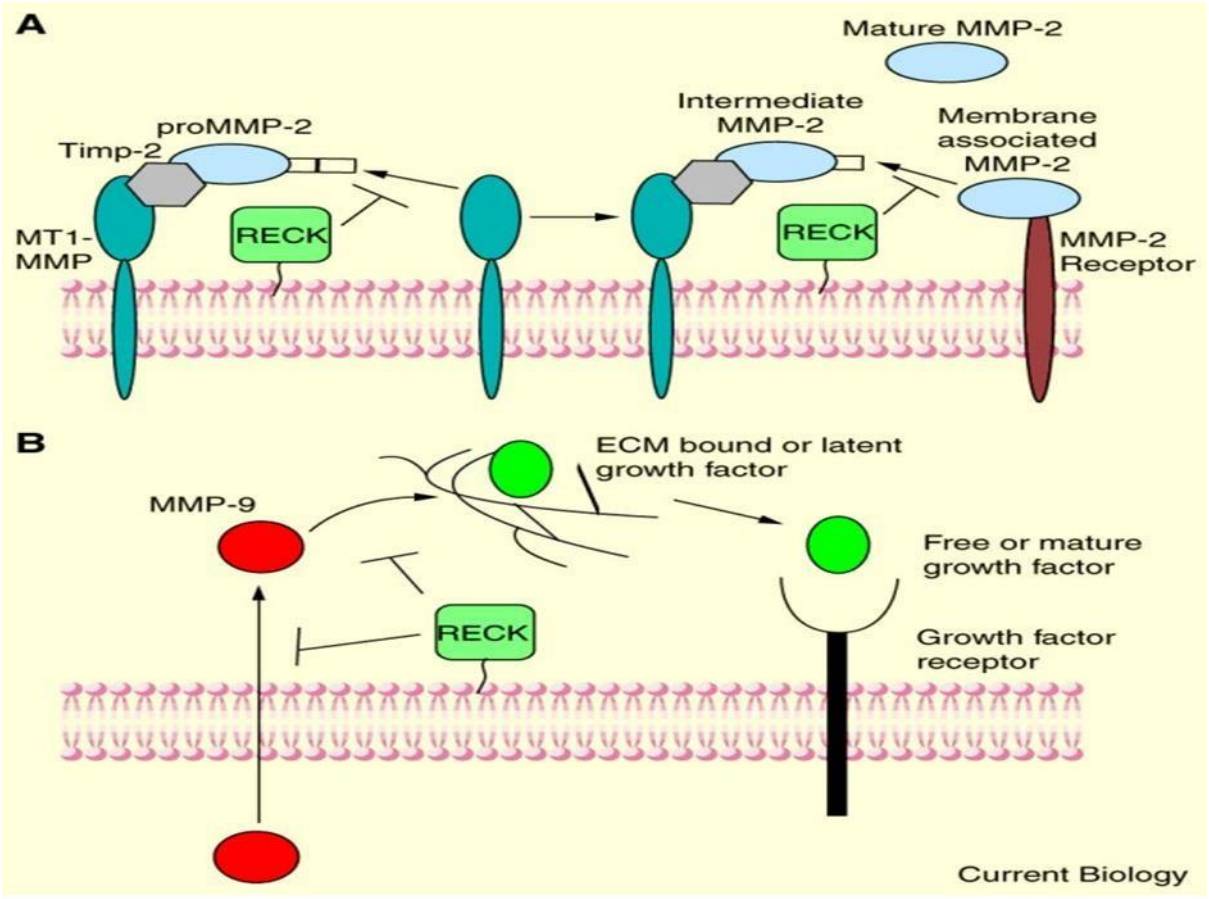
RECK protein bjelančevina je bogata cisteinom (oko 9%) i uključuje hidrofobne regije na oba kraja NH2 i COOH. Kraj NH2 djeluje kao signalni peptid, dok COOH kraj služi kao ligand za vezivanje za glikozilfosfatidilinozitol (GPI). U sredini RECK proteina nalaze se tri domene poput inhibitora serinske proteaze (eng. *serine protease inhibitor-like* - SPI). Početni dio srednje domene odgovara Kazal motivu, a drugi i treći dio ne. Smatra se da su ovi SPI odgovorni za inhibiciju aktivnosti proteaze, odnosno za inhibiciju aktivnosti MMP2 i MMP9. Točan mehanizam je nepoznat, ali se spekulira da je to ili hvatanjem „u klopku“ (eng. *trapping*) ili povratnim čvrstim vezanjem (eng. *reversible tight binding*) za MMP (23). U središnjoj domeni proteina postoje dvije regije koje izgledaju poput epidermalnog čimbenika rasta (eng. *epidermal growth factor* - EGF). Jedna od njih je smještena u prvoj trećini proteinske sekvence.

Karakterizirana je peterostrukim ponavljanjem cisteina koji ima značajnu ulogu jer sadrži nekoliko mjesta za glikozilaciju na ostacima asparagina. Ova su mjesta neophodna za pravilno međudjelovanje s MMP2 i MMP9, što je glavna funkcija RECK proteina (Slika 1.) (23).

RECK protein funkcionira primarno u tkivnom remodeliranju i kontrolira aktivnost remodelirajućih enzima kao što su MMP, a posebno MMP9. Regulira i MMP2, kao i membranski tip 1-MMP koji sudjeluju ne samo u prijevremenom prsnuću plodovih ovoja, nego imaju ulogu i u progresiji karcinoma (Slika 2.) (23,24,27). Također inhibira i oslobađanje proMMP9 iz stanice. Podaci govore da se ta inhibicija događa preko nekoliko različitih mehanizama koji uključuju direktnu inhibiciju aktivnosti proteaza, regulaciju njihovog oslobađanja iz stanice kao i moguću sekvestraciju MMP-a na staničnoj površini. RECK igra važnu ulogu i u vaskulogenezi (27,28). Do sada nije bilo dokaza da RECK ima veze s PPROM ili prijevremenim porodom.




Slika 1. Mjesta glikozilacije označavaju područja središnje funkcija RECK proteina. Preuzeto iz: *Alexius-Lindgren M, Andersson E, Lindstedt I, Engstrom W. The RECK gene and biological malignancy--its significance in angiogenesis and inhibition of matrix metalloproteinases. Anticancer Res 2014;34(8):3867-73*.




Slika 2. Aktivnost RECK proteina. Preuzeto iz: *Welm B, Mott J, Werb Z. Developmental biology: vasculogenesis is a wreck without RECK. Curr Biol 2002;12(6):209-11*.

## 1.5. INTERLEUKIN 6

Interleukin 6 (IL-6) biokemijski pripada u skupinu citokina građenih od četverostruke zavojnice. Ovaj citokin mogu stvarati i izlučivati različite stanice. Fiziološki, interleukin 6 je uključen u regulaciju hematopoeze i koordinaciju urođenog i stečenog imuniteta. Dodatno, interleukin igra važnu ulogu u regulaciji metabolizma, razvoju živčanog sustava kao i u nastanku, razvoju i održanju različitih vrsta raka. Osim prije navedenih, interleukin 6 ima čitav niz uloga poput poticanja i diferencijacije B limfocita i poticanja hepatocita na stvaranje CRP. U početku je za svaku od njegovih bioloških uloga bio dodijeljen poseban naziv, ali kasnije, kada se shvatilo da je riječ o istom medijatoru, takvo nazivlje je napušteno (29–32). Ponekad pokazuje značajke slične hormonima koji imaju utjecaja na homeostatske procese (29,32). Interleukin 6 žurno se i prolazno proizvodi kao odgovor na infekciju i tkivnu ozljedu. Doprinosi obrambenom odgovoru domaćina poticanjem stvaranja proteina poput akutne faze, hematopoeze i imunog odgovora (29).

Gen koji kontrolira sintezu IL-6 smješten je na kratkom kraku sedmog kromosoma - 7p15.3. Osnovni produkt gena protein je veličine 20 kDa, ali nakon glikozilacije doseže veličinu od 21 - 26 kDa. Najčešće se navodi da glikoprotein ima molekularnu težinu 26 kDa (29,31).

Iako doprinosi obrambenom odgovoru domaćina stvaranjem proteina akutne faze, uloga IL-6 ovisi o kontekstu, tako da može biti pro i protuupalna te se danas smatra ciljnom točkom nekih kliničkih oblika liječenja. Međutim, signalni put kojim IL-6 ostvaruje svoje djelovanje je kompleksan i još nije u potpunosti razjašnjen (29,32,33). Klinička iskustva u liječenju antagonistima IL-6 postavila su i neka nova pitanja o ulozi IL-6 u raznim fiziološkim i patološkim procesima (32).

IL-6 stvara se na mjestu lokalnog oštećenja te krvotokom dolazi do jetre. Tamo dolazi do brzog i opsežnog poticanja hepatocita da stvaraju proteine akutne faze poput CRP, serumskog amiloida A (SAA), fibrinogena, haptoglobina i a1-antikimotripsina (29,30).

Za sada je poznato da svoje djelovanje ostvaruje preko receptora za IL-6 koji se nalazi na površini raznih stanica, ali ovaj receptor nije u mogućnosti samostalno stvarati unutarstanični signal. Taj receptor, nakon što se veže s IL-6, priljubljuje se uz signalni receptorski glikoprotein 130 kDa (gp130), koji se dimerizira i tako započinje unutarstanični signalni put (29,33). Blokada djelovanja IL-6 neutralizirajućim monoklonalnim protutijelima (tocilizumab) je odobrena u više od 100 zemalja za liječenje autoimunih bolesti poput reumatoidnog artritisa (33).

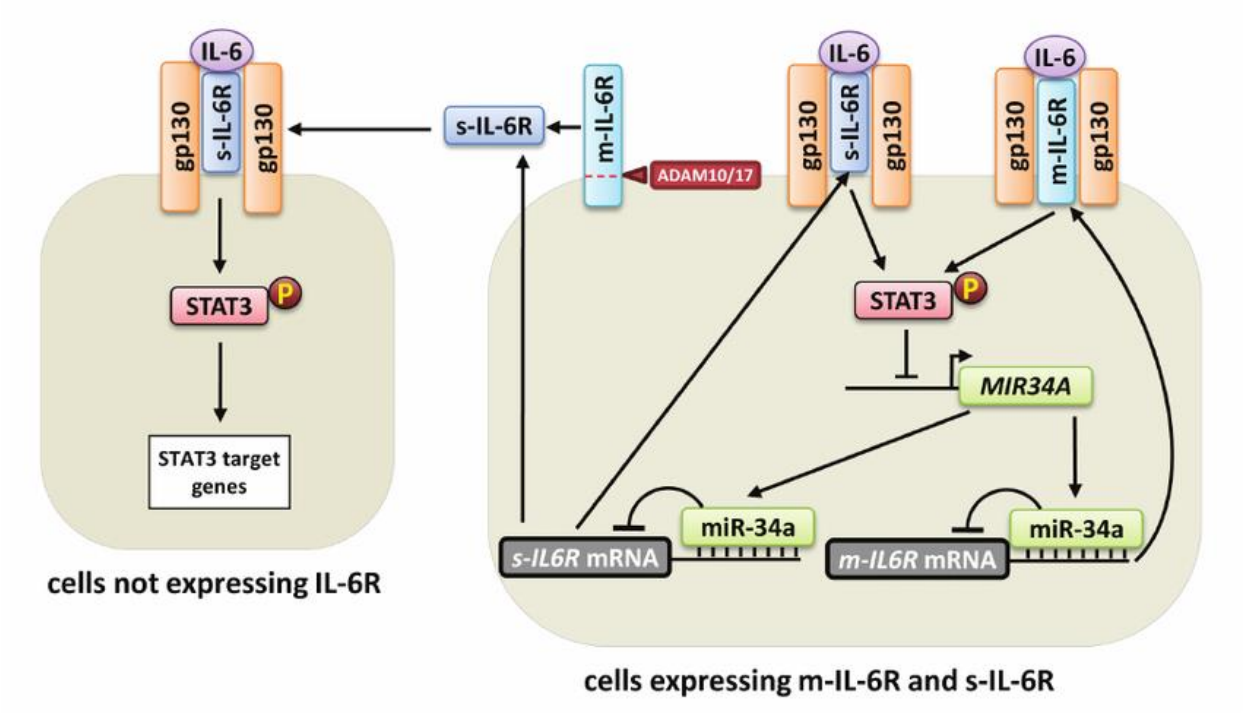
Poticanje hepatocita na stvaranje fibronektina, albumina i transferina tijekom upale je smanjeno (29,30). Interleukin 6 uključen je u regulaciju serumskih koncentracija cinka i željeza putem kontrole sinteze njihovih transportera. Naime, tijekom upale, IL-6 potiče produkciju hepcidina,

koji blokira učinak transportera željeza feroportina 1 u crijevima te na taj način smanjuje serumsku razinu željeza. Osim toga smanjuje izražajnost transportera cinka na hepatocitima pa je odgovoran za njegovu sniženu serumsku razinu koja se viđa tjekom upale. To znači da IL-6 putem hepcidina ima značajnu ulogu u nastanku anemije kod kroničnih upalnih bolesti (29,34,35).

Niz studija pokazao je povećanu koncentraciju IL-6, čimbenika tumorske nekroze alfa (TNFα), IL 1b (IL-1b), kao i interleukina 8 (IL-8) u plodovoj vodi žena koje su imale prijevremeni porod, pogotovo u onih u kojih je kultura plodove vode dokazala postojanje mikroorganizama ili im je histološki dokazan korioamnionitis (31,36). Prije smo naveli da svoje djelovanje ostvaruje preko receptora za IL-6 koji su smješteni na površini raznih stanica (Slika 3). Četverostruka zavojnica IL-6 veže se za receptor, a nakon toga taj se kompleks veže s drugim proteinskim receptorom, glikoproteinom 130 kDa (gp130), koji se dimerizira te započinje unutarstanični signalni put. Taj put obuhvaća Janus kinazu (JAK)/signalni pretvarač i aktivator transkripcije (eng. *signal transducer and activator of transcription* - STAT) proto onkogen/mitogen-aktivirane protein kinaze i proto onkogen (ras)/mitogen-aktiviranu protein kinazu i fosfoinozitid kinaza put (eng. *activated protein kinase and phosphoinositide-3 kinase pathways*) (33,35). Važno je istaknuti da Il-6 pokazuje afinitet za vezanje samo za IL-6R, ali ne i za gp 130 kao što se i IL-6R ne veže za gp 130. Samo kompleks IL-6 i IL-6R može se vezati s gp 130, inducirati njegovu dimerizaciju i nakon toga započeti prije navedeni unutarstanični signalni put (33). Sve stanice u ljudskom tijelu imaju na površini gp 130, ali samo neke, poput hepatocita i nekih leukocita, imaju i IL-6R. To znači da samo stanice koje na površini imaju gp 130 i IL-6R mogu biti stimulirane IL-6 (29,33,35). Literaturne navode o tome ima li na površini stanica plodovih ovoja gp 130 i IL-6 nismo našli. Zamijećeno je da se veza IL-6R sa staničnom membranom može razgraditi djelovanjem matriksmetaloproteinaza koji su vezani s njom, a najviše ADAM 17. Na taj način nastaje topivi IL-6R (eng. *soluble IL-6R; sIL-6R)*(33).

Do sada je poznato da IL-6 svoje raznolike aktivnosti ostvaruje putem dva signalna puta. To su klasični i trans signalni. Kod klasičnog puta IL-6 se veže za transmembranske IL-6 receptore, dok se u slučaju trans signalnog puta veže za topivu inačicu IL-R6 (eng. *soluble interleukin-6 receptor*). Klasični put uključuje vezanje IL-6 za istoimeni transmembranski receptor što izaziva homodimerizaciju bjelančevine gp130. Aktiviranje ovog puta rezultira u poticanju ekspresije gena osjetljivih na IL-6. Trans signalni put je drugi način kojim IL-6 ostvaruje svoj učinak putem vezanja za topivu inačicu IL6 receptora (IL-R6) koja se nalazi u ljudskom serumu. Ova forma receptora nema transmembranski i citoplazmatski dio što onemogućuje aktiviranje klasičnog signalnog puta (29,33,37). Zanimljivo je da većina stanica koja na površini imaju IL-

6R, uključujući hepatocite, ima na površini više gp130 nego IL-6R molekula. Stoga će poticanje tih stanica IL-6 dovesti do aktivacije samo dijela gp130 molekula, dok će poticanje kompleksom IL-6 i IL-6R aktivirati sav stanični gp130. Prag za navedeni odgovor ne može biti postignut poticanjem IL-6 već samo kompleksom IL-6 i IL-6R. To bi moglo biti objašnjenje za zamijećene razlike u unutarstaničnom signaliziranju između trans i klasičnog signalnog puta koji vode do drugačijeg staničnog odgovora (29,33,34).




Slika 3. Aktivnost IL-6 receptora. Preuzeto iz: *Hermeking H, Rokavec M, Huihui H. Soluble IL6R represents a miR-34a target: Potential implications for the recently identified IL-6R/STAT3/miR-34a feed-back loop.Oncotarget 2015;6(17):14026-32.*

## 1.6. PRIJEVREMENI POROĐAJ

### 1.6.1. Definicija, incidencija i podjela

Prijevremeni porođaj (PP) je onaj koji nastupi prije navršenih 37 tjedana trudnoće. Donja granica PP nije svugdje jednako prihvaćena. Po Međunarodnoj klasifikaciji bolesti iz 2001. to je 22 navršena tjedna ili 154 dana od prvog dana zadnje menstruacije. U slučaju kada prvi dan zadnje menstrucije nije poznat, kao granica se postavlja porođajna masa ≥500 grama (38). U nekim sustavima zdravstvene skrbi kao donja granica navodi se i 20 te 24 tjedna. Bez obzira koju od navedenih gestacijskih dobi uzeli kao donju granicu prijevremenog porođaja, one u svakom slučaju predstavljaju izrazitu nedonošenost sa svim zdravstvenim rizicima koje novorođenče iz te trudnoće, tj. porođaja ima. Ne postoji jedinstvena podjela prijevremenog porođaja. Trenutno ih postoji nekoliko. Najčešće se dijele temeljem gestacijske dobi (trajanju trudnoće) i kliničkog pojavnog oblika. Temeljeno na gestacijskoj dobi PP dijeli se na: porod < 28 tjedana (iznimno rani PP), s učestalošću oko 5%, onaj između navršenih 28-$31^{+6/7}$ tjedana (rani PP) - učestalost oko 15%, zatim između 32-$33^{+6/7}$ navršena tjedna (umjereni PP) čija se učestalost kreće oko 20% te na kraju porod između 34-$36^{+6/7}$ tjedna (blagi ili granični PP) čija je učestalost oko 60-70% (39). Temeljem kliničke pojavnosti, odnosno u kliničkom pogledu, neki autori navode podjelu na spontani i jatrogeni. Većina pak autora, u kliničkom pogledu dijeli PP na spontani prijevremeni porod, predterminsko prijevremeno prsnuće plodovih ovoja (PPPPO) (eng. *preterm premature rupture of membranes* - PPROM) te jatrogeni PP, zbog majčinskih ili fetalnih indikacija (1,39). Neki autori navode i podjelu temeljem uzroka, a podvrste su iste kao i kod podjele temeljem kliničke pojavnosti (39).

Spontani prijevremeni porod (obuhvaća oko 50% PP) započinje trudovima prije navršenog 37 tjedna trudnoće. Predterminsko prijevremeno prsnuće plodovih ovoja (20-25%) započinje prsnućem ovoja dva sata prije početka trudova prije navršenog 37. tjedna trudnoće. Jatrogeni PP može se izazvati zbog majčinskih ili fetalnih indikacija, a obuhvaća oko 30-35% (40). Svake godine se u svijetu rodi 15 milijuna nedonošene djece i taj broj stalno raste. Iako je broj prijevremenih porođaja u porastu, postoje značajne razlike u pojavnosti njegovih raznih kliničkih oblika. Tako u zemljama koje su karakterizirane nižom razinom perinatalne skrbi prevladavaju oblici sa spontanim prijevremenim prsnućem plodovih ovoja prije termina, dok u onima s višom razinom zdravstvene zaštite zastupljenija je forma jatrogenog porođaja (9,39). U Europi, u zemljama sličnog stupnja gospodarskog razvoja i perinatalne skrbi, stopa prijevremenog porođaja značajno varira, od 5-10% (38). Incidencija porasta stope prijevremenog porođaja i u

drugim razvijenim zemljama je slična. U apsolutnim brojevima u SAD-u, u razdoblju od 1996. do 2004., došlo je do porasta broja jednoplodnog prijevremenog poroda od preko 60 000. Najveći dio odnosio se na blagi tj. granični prijevremeni porod, a najčešći način dovršetka bio je carskim rezom, u preko 92% slučajeva (41,42). Od 1990. godine došlo je do porasta višeplodovih trudnoća od preko 400%. Iz brojnih epidemioloških studija znamo da je učestalost PP u blizanačkim trudnoćama oko 50%. Stoga je jasan njihov doprinos povećanju ukupne stope prijevremenog poroda (43). Direktne i indirektne posljedice nedonošenosti glavni su uzrok smrti djece mlađe od 5 godina. U SAD-u, 17-34% novorođenačkih smrti povezano je direktno ili indirektno s nedonošenošću (42,43). U Europi oko 75% svih neonatalnih i oko 60% smrti djece povezano je s posljedicama nedonošenosti (38). Prijevremeni porod jedan je od najvećih javnozdravstvenih problema. Godišnje se u SAD-u potroši oko 26 milijardi USD na troškove medicinske i druge skrbi koje su vezane uz taj problem (44,45). Općepoznato je da nedonošena djeca, u usporedbi s donošenima, imaju veći rizik respiratornog distres sindroma (RDS), intraventrikularnog krvarenja, bronhopulmonalne displazije, otvorenog duktus arteriozusa, nekrotizirajućeg enterokolitisa, sepse, apneje i retinopatije nedonoščadi. Dodatno, nose doživotni rizik raznih intelektualnih i mentalnih poremetnji, cerebralne klijenuti, drugih smetnji probavnog i dišnog sustava i ostalih različitih komplikacija, a rizik je obrnuto razmjeran trajanju trudnoće (45).

### 1.6.2. Čimbenici rizika

U preko polovine slučajeva točan uzrok prijevremenog poroda ostaje nepoznat. U takvim situacijama pribjegavamo identifikaciji činitelja rizika temeljem kojih možemo prepoznati rizične trudnice tj. trudnoće. Hipotetski govoreći, poremećen odnos između raznih činitelja rizika i zaštitnih faktora dovodi do nastanka prijevremenog poroda, odnosno činitelji rizika možda pobuđuju aktivacijske čimbenike PP (46). Brojni su čimbenici rizika za prijevremeni porod, kao i njihove podjele. To su: majčinska dob niža od 17 i iznad 35 godina, nizak socioekonomski i obrazovni status, crna rasa, nedostatak emocionalne potpore, visok indeks tjelesne mase (eng. *Body Mass Index* - BMI), značajan prirast tjelesne mase u trudnoći, pušenje, korištenje opijata, konzumacija alkohola, prethodna fetalna ili novorođenačka smrt, operativni zahvat na maternicnom vratu, zanimanje, kratko razdoblje između dviju trudnoća, prethodni prijevremeni porođaj, preegzistentne bolesti majke - prije svega dijabetes i hipertenzija, preeklampsija u prethodnoj trudnoći, neliječene vaginalne i infekcije mokraćnog sustava, anemija, trudnoća iz medicinski potpomognute oplodnje, nedostatak folne kiseline, višeplodova trudnoća, uterine,

cervikalne ili posteljične anomalije te prethodno inducirani pobačaji (38,45). Od podjela činitelja rizika za prijevremeni porod najčešće se navodi ona na primarne i sekundarne. U primarne spadaju oni koje otkrijemo tijekom prvog pregleda u trudnoći, a obuhvaćaju one iz opstetričke anamneze (preegzistentne bolesti, prethodni spontani pobačaj i/ili prijevremeni porođaj, razvojne anomalije uterusa), antropometrijske podatke te one iz socioekonomske sfere. Sekundarni su oni koji se razviju tijekom trudnoće i vezani su uz nju. To su višeplodne trudnoće, krvarenje tijekom rane trudnoće, trudnoća nakon medicinski pomognute oplodnje, razni oblici hipertenzivne bolesti u trudnoći, poremetnja metabolizma šećera, intrahepatička kolestaza i usporenje rasta ploda (1).

### 1.6.3. Početak poroda

Bez obzira je li riječ o terminskom ili prijevremenom, porod započinje promjenama koje obuhvaćaju maternični vrat, miometrij te deciduu i plodove ovoje, a naziva se zajednički put poroda (eng. *common pathway of parturition*). Promjene uključuju smekšavanje tj. sazrijevanje maternicnog vrata, stalne kontrakcije miometrija, pojačane i redovite kontrakcije endometrija te metaboličku aktivaciju decidue i plodovih ovoja (Slika 4.). Današnje razumijevanje tih zbivanja zasniva se na promjeni stanja miometrija iz mirnog u aktivno – kontraktilno, što je povezano s promjenama iz protuupalnog u proupalno stanje. U proces su uključeni različiti kemokini (IL-8), citokini (IL-1 i IL-6) te porast razine bjelančevina povezanih s pojačanom kontraktilnošću (receptori za oksitocin i prostaglandine te koneksin)(47). Temeljna razlika je u tome što je u slučaju terminskog poroda riječ o normalnom fiziološkom događaju. U slučaju prijevremenog poroda, radi se djelomično ili u potpunosti o procesu koji je patološki, što rezultira aktiviranjem jednog ili više dijelova zajedničkog puta. Klinički se može manifestirati kao:

1. slabost maternicnog vrata (ako je primarno zahvaćen maternični vrat)
2. kontrakcije maternice (ako zahvaća miometrij)
3. prsnuće plodovih ovoja (ako je proces započeo na njima).

U fiziološkim trudnoćama najprije se zbivaju promjene na maternicnom vratu (tjednima prije) na što se nadovezuje povećana kontraktilnost miometrija. Pojava fetalnog fibronektina u cervikalnoj sluzi pokazatelj je razgradnje izvanstaničnog matriksa te aktivacije decidue i plodovih ovoja (42). Klinički tijek poroda mjeri se u satima, međutim promjene koje će njime rezultirati zbivaju se znatno prije, tijekom pripremne faze. Studija koja je usporedila uzorke miometrija izuzete tijekom carskog reza u žena koje su imale elektivni i žurni carski rez pokazale su da je aktivnost gena odgovornih za sintezu interleukina 8 i superoksid dismutaze pojačana u

oba slučaja (42,47). Važnu ulogu ima kortikotropin oslobađajući hormon (eng. *corticotropin-releasing hormone* - CRH) koji se stvara u posteljici, a prvenstveno luči u majčinu plazmu. Koncentracija bjelančevine koja veže kortikotropin oslobađajući hormon (eng. *corticotropin-releasing hormone binding protein* - CRHBP) pred kraj trudnoće pada, što povećava bioraspoloživost CRH. Koncentracija CRH u majčinoj plazmi raste eksponencijalno kako trudnoća napreduje i doseže vrhunac u vrijeme poroda. Žene koje rađaju prijevremeno, u usporedbi s onima koje rađaju nakon termina, imaju ubrzan eksponencijalni rast (48–50). Međutim, nisu svi slučajevi prijevremenog poroda povezani s promjenama u porastu koncentracije CRH, posebice kod unutarmaternične infekcije. Važnija je stopa porasta nego apsolutna vrijednost jer kod trudnica postoje velike fiziološke varijacije CRH (66,67). Receptori za CRH u majke nalaze se u hipofizi, miometriju te vjerojatno nadbubrežnoj žlijezdi, dok se u fetusa, uz hipofizu i nadbubrežnu žlijezdu, možda nalaze i u plućima. Postoji nekoliko vrsta CRH receptora u miometriju, a najčešći je CRHR1α. Vezanjem za njega oslobađaju se unutarstanični posrednici koji rezultiraju relaksiranjem mišićnih stanica. U terminu, CRH receptori manje su učinkoviti u relaksaciji mišićnih stanica jer se vezanjem CRH aktivira put koji je povezan s aktivacijom protein C kinaze i pojačanom kontraktilnošću (51). Proizvodnju kortikotropin oslobađajućeg hormona iz posteljice inhibiraju estrogen, progesteron i dušikov oksid (48). Ljudi i čimpanze stvaraju značajno više progesterona u trudnoći u usporedbi s drugim vrstama i ta produkcija tijekom trudnoće raste (42,52). Moguće je da otkrivene razlike u razini izoformi ljudskih receptora za progesteron, njihovih koreceptora i koaktivatora te u inhibitornim putovima koji su rezultat upale, dovode do funkcionalno smanjene uloge progesterona (53). Nažalost, druge studije ove nalaze nisu potvrdile (42,54). Još uvijek nije jasno jesu li ove promjene dovoljne za porod u ljudi. Usporedne analize kodirajućih egzona za progesteronski receptor pokazale su veću adaptivnu evoluciju u ljudi i čimpanza u usporedbi s drugim primatima što bi moglo biti razlog za biološku aktivnost progesterona u trudnoći (55).

### 1.6.4. Uzroci nastanka PP

Prijevremeni porod može biti klinička manifestacije infekcije, prekomjernog rastezanja maternice (u višeplodovim trudnoćama), stresa majke i fetusa, fetalne hipoksije, imunološkog neprepoznavanja ili nekog drugog nepoznatog procesa (Slika 5.). Najčešće nekoliko ovih činitelja zajedno sudjeluje u nastanku kliničke slike. Prijevremeni porod je sindrom za koji po definiciji ne može biti jedinstvenog testa probira i/ili liječenja. Sindromi u opstetriciji imaju zajedničke značajke: višestruka etiologija, kroničnost, fetalna uključenost, kliničke manifestacije

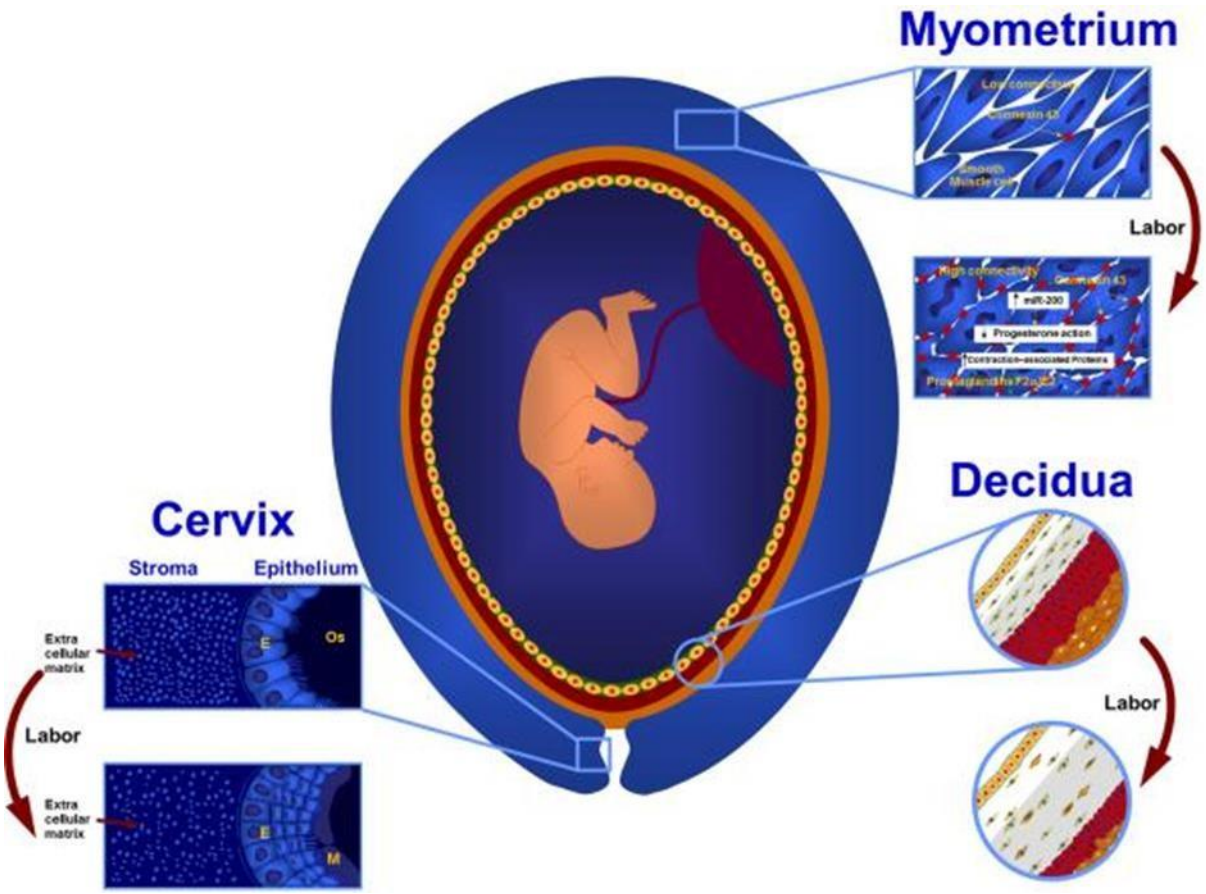
koje su prilagodljive tj. različite i promjenljiva osjetljivost zbog međudjelovanja okoliša. Patološki procesi uključeni u aktivaciju zajedničkog puta u sindromu prijevremenog porođaja su unutarmaternična ili sistemska infekcija, prekomjerno rastezanje uterusa, ishemija maternice i posteljice te decidualno krvarenje, nenormalna reakcija na alograft, uzroci povezani s alergijom, insuficijencija materničnog vrata kao i endokrine poremetnje.

Mikrobiološke i histopatološke studije pokazuju da je zahvaćenost amnijske šupljine infekcijom u trudnica s prijevremenim porođajem do 10%, a u onih s prijevremenim prsnućem vodenjaka i do 30% (56). Infekcija je povezana s 25% svih prijevremenih porođaja. Što trudnoća kraće traje udio je infekcije u etiologiji prijevremenog poroda veći. U 23. tjednu imamo bakterijsku kolonizaciju u 79% trudnoća (57). Najčešće se u trudnica ne vide kliničke značajke intrauterine infekcije, mada kasnije patohistološki nalazi potvrđuju njeno postojanje. Dva su moguća zaključka iz ovog podatka. Prvo, lokalna upalna reakcija reflektira ranu aktivaciju uz uobičajenu kaskadu događaja u kojoj su inducirani proupalni medijatori poput prostanoida i citokina. Drugo, upala ima glasnike koji se ne mogu otkriti uobičajenim laboratorijskim pokazateljima korištenim u svakodnevnom radu (42,48). Treba uzeti u obzir i hipotezu da prijevremeni porod nije posljedica infekcije nekim posebnim mikroorganizmom već promjena u bakterijskom sustavu rodnice - bakterijske vaginoze. Provedena istraživanja nisu potvrdila ove pretpostavke (58). Posrednici koji su odgovorni za početak prijevremenog poroda u slučaju unutarmaternične infekcije (citokini i drugi posrednici upale) slični su onima koji štite domaćina od infekcije. Stoga bi se prijevremeni porod mogao tumačiti i kao zaštitni mehanizam za majku i dijete (42). Mikrobiom je pojam koji obuhvaća sve mikroorganizme, njihove genske elemente (genom) te međusobne interakcije u određenoj okolini. S obzirom na to da ljudsko tijelo sadrži deset puta više mikroorganizama nego vlastitih stanica, možemo govoriti o složenim i karakterističnim zajednicama prisutnim u različitim dijelovima tijela (39,42). Laktobacili se već dugo smatraju dominantnom bakterijom rodnice s važnom zaštitnom ulogom. Ipak, specifični mehanizmi kojima oni ograničavaju rast stranih mikroorganizama i način na koji sudjeluju u očuvanju svoje mikrookoline još nisu poznati. Smatra se da laktobacili razgradnjom ugljikohidrata dovode do nakupljanja mliječne kiseline te posljedičnog snižavanja pH vrijednosti rodnice na obrambenu razinu nižu od 4,5. Svako jedinično smanjenje pH vrijednosti dovodi do porasta oksidacijsko - redukcijskog potencijala za 60 mV, pri čemu se dodatno inhibira rast anaerobnih bakterija. Oni također stvaraju i baktericine, proteine male molekularne težine koji mogu spriječiti rast velikog broja mikroorganizama, uključujući i bakteriju *Gardnerella vaginalis*. U aerobnim uvjetima neki laktobacili mogu stvarati vodikov peroksid, još jedan od inhibitora anaerobnih i drugih (posebice katalaza-negativnih) mikroorganizama (39). Prekomjerno rastezanje uterusa glavni je činitelj

rizika prijevremenog poroda u višeplodovim trudnoćama te u stanjima povezanim s polihidramnijem. U terminskim trudnoćama štakora povećana je izražajnost receptora za oksitocin, koneksin 43 i c-fos mRNA(59–61). Progesteron spriječava ekspresiju gena prouzročenu rastezanjem uterusa.

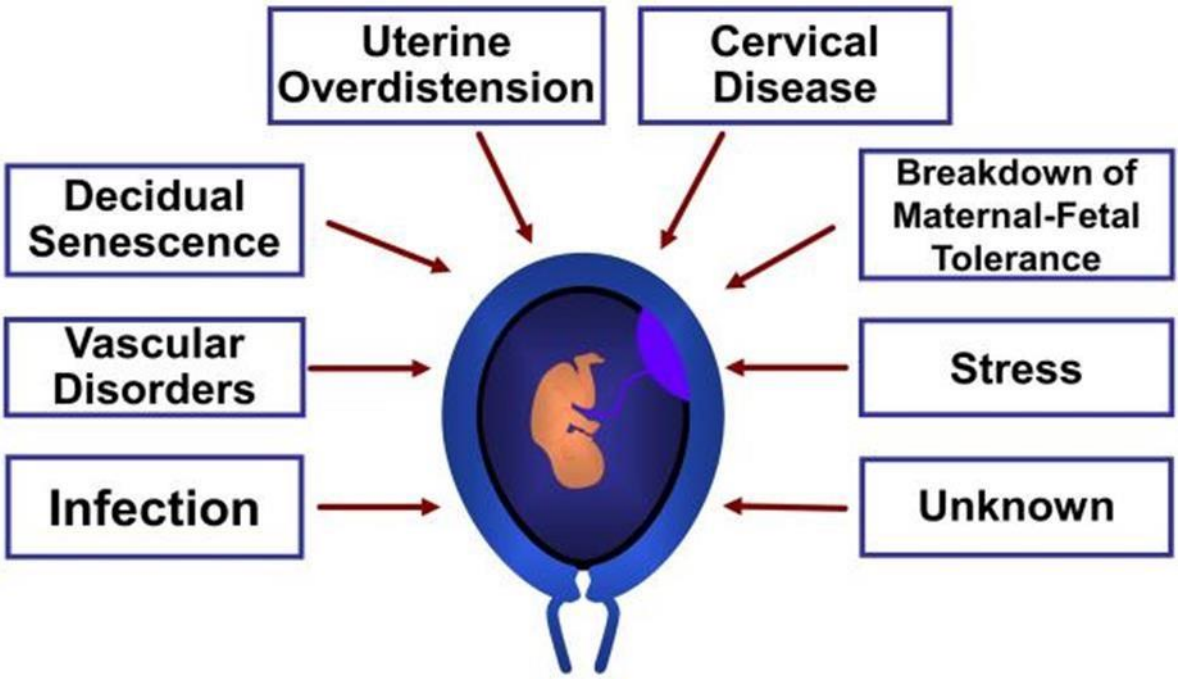
Rastezanje maternice ima utjecaja i na membrane u kojima se povećava aktivnost različitih matriksmetaloproteinaza, a smanjuje njihovih inhibitora (62). Najčešće histološke promjene u posteljicama trudnica koje su rodile prijevremeno, upalne su promjene povezane s infekcijom te promjenama placentacije (ateroza, tromboza, neprimjerena pretvorba krvnih žila) i djeteta (smanjen broj arteriola u resicama, tromboze fetalnih arterija). Predloženi mehanizam koji povezuje vaskularne lezije i prijevremeni porod je uteroplacentarna ishemija što je posljedica neodgovarajuće pretvorbe krvnih žila tijekom procesa placentacije. Točna poveznica nije jasna, ali čini se da dolazi do povećane proizvodnje renina iz plodovih ovoja.

Angiotenzin II može pojačati kontraktilnost miometrija direktno ili preko prostaglandina (63,64). Decidualna nekroza i krvarenje mogu aktivirati mehanizam prijevremenog poroda putem trombina koji potiče kontraktilnost miometrija (65–67). Zanimljive su hipoteze o prijevremenom porodu kao reakciji odbacivanja semialografta, dok ona o alergijskoj reakciji (tip I) za sada nije značajnije prihvaćena (68,69). Trenutno su predmet istraživanja promjene u izoformi progesteronskih receptora. Vezivanjem za progesteronski receptor B (PR-B) odvija se najveći dio njegova učinka. Progesteronski receptori A i C (PR-A i PR-C) nemaju na N kraju terminal–aktivirajuće domene i u nekim slučajevima služe kao dominantni represori funkcije PR-B (70). Početkom poroda omjer receptora za progesteron se mijenja na način koji bi mogao odražavati mehanizam ustezanja djelovanja progesterona (71). Predloženi mehanizam funkcionalnog smanjenja progesteronske aktivnosti jest da pojačana izražajnost PR-A u miometriju smanjuje njegov učinak tj. da je pojačana izražajnost tih receptora u usporedbi s PR-B (72–74). Dodatno se spominje da aktivacija transkripcijskog čimbenika NF-kapa B (eng. *nuclear factor kappa b transcription factor*) u amniju onemogućava djelovanje progesterona (75). Neovisno o tome koji je od navedenih mehanizama (ili su to svi) uključen u smanjeno djelovanje progesterona, dolazi se do spoznaje da je proces dominantno smješten u miometriju tijekom poroda. Zaključno, prijevremeni porod može se shvatiti kao sindrom čija je klinička slika (prijevremeno prsnuće plodovih ovoja i sazrijevanje cerviksa te otvaranje unutarnjeg ušća) rezultat različitih etiologija, samostalno ili u kombinaciji. Ti okidači mogu djelovati akutno (npr. prijevremeno odljuštenje normalno nasjele posteljice), ali najčešće su subakutni. Prema tome, patološki procesi koji mogu dovesti do prijevremenog poroda mogu djelovati istovremeno s fiziološkim pripremama za porod naročito ako je riječ o trudnoći nakon 32. navršenog tjedna.




Slika 4. Sazrijevanje cerviksa  i aktivacija decidualne membrane u blizini cerviksa

Preuzeto iz*: Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. Science 2014;345(6198):760-5*.




Slika 5. Pretpostavljeni mehanizmi nastanka prijevremenog poroda

Preuzeto iz: *Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. Science 2014;345(6198):760-5.*

## 1.7. KORIOAMNIONITIS *VS*. SINDROM INTRAAMNIJSKE INFEKCIJE (SIAI)

Klasična literatura pod latinskim nazivom chorioamnionitis podrazumijeva kliničku i histološku dijagnozu istog upalnog stanja. U oba slučaja podjela dalje razlikuje akutni i kronični oblik. „Histološki akutni korioamnionitis“ obilježava prisutnost polimorfonuklearnih leukocita na predmetnom staklu, a kronični nakupljanje limfocita. Time bi se akutni oblik mogao povezati s bakterijskom, a kronični s virusnom etiologijom infekcije. Za razliku od toga kliničari akutnim korioamnionitisom nazivaju bolest naglog početka praćenu sistemskim znakovima infekcije (povišena temperatura, tresavica, zimica), dok kroničan ili subakutni oblik s kliničkim predznakom karakterizira postepen početak, najčešće s lokalnim i bez sistemskih znakova infekcije. Obzirom da je nomenklatura histološke i kliničke podjele korioamnionitisa identična, a temelji se na različitim odrednicama, dogovoreno je da se pojam korioamnionitisa zadrži u histološkoj karakterizaciji. Kliničarima je određen novi termin istog stanja kroz međunarodno priznatu dijagnozu sindroma intraamnijske infekcije (SIAI), jednakog akronima na engleskom, latinskom i hrvatskom jeziku. Na taj su način vješto izbjegnute moguće zabune pa je sada moguće koristeći se objema dijagnozama bolje opisati infekciju u pojedine pacijentice. Primjer može biti npr. subakutni SIAI s kroničnim korioamnionitisom u patohistološkom preparatu (47,76,77).

## 1.8. HISTOLOŠKI KORIOAMNIONITIS

Korioamnionitis se u patohistološkom smislu definira kao upala posteljice, plodovih ovoja i plodove vode prouzročena infektivnim agensima. U 30% slučajeva intraamnijskih infekcija identificiraju se bakterije u fetalnoj cirkulaciji (47,76). Kod majki jednog od tri prijevremeno rođena djeteta prisutna je intraamnijska infekcija koja je uglavnom subklinička (76,77). Mikroorganizmi koji se izoliraju iz amnijske tekućine slični su onima koji se nađu u donjem dijelu genitalnog trakta, tako da je uzlazni put infekcije najčešći, ali bakterije se mogu širiti i hematogeno te transplacentarno prijeći u plod (7,77). Novije studije pokazuju da virusi mijenjaju imunološku obrambenu sposobnost sluznice donjeg dijela genitalnog trakta i predispozicija su za uzlazni put infekcije (47). Pravovremenu dijagnozu intraamnijske infekcije može otežavati ograničenost upale na amnijsku šupljinu, zbog čega je pronalazak mikrobiološke invazije moguć jedino amniocentezom, invazivnom procedurom koja zahtijeva odgovarajuće vještine (78,79).
PCR kao metoda detekcije bakterija bolja je u odnosu na detekciju bakterija kultiviranjem (80). Takva infekcija može biti tjednima ili mjesecima u latentnom obliku. Stoga se u trudnica najčešće ne vide kliničke značajke intrauterine infekcije, već kasniji patohistološki nalazi potvrđuju njeno postojanje. To pokazuje da upala ima glasnike koji se ne mogu otkriti uobičajenim laboratorijskim pokazateljima korištenim u svakodnevnom radu. Smatra se i da infekcijama uzrokovani prematuriteti involviraju urođeni imuni odgovor prema patogenu, što uzrokuje upalu. U slučajevima korioamnionitisa, mikroorganizmi su prepoznati od strane Toll-like receptora (TLR) i to onda rezultira produkcijom proupalnih citokina (IL-6, IL-beta, TNF-a), kemokina (IL-8, IL-1, CCL-2), prostaglandina, reaktivnih radikala kisika i posljedično sintezom i otpuštanjem MMP koja onda aktivira proces prijevremenog poroda početkom kontrakcija miometrija i induciranjem prsnuća plodovih ovoja (77,81). Neki autori sugeriraju da je IL-6 uključen u kontrolu nivoa ekspresije MMP-9 u intraamnijskoj infekciji (82).
Infekcije izvan genitalnog trakta, kao što su pijelonefritis i pneumonija, također mogu biti povezane s PP (7,47,77). Histološki, kod korioamnionitisa dolazi do infiltracije neutrofilnih lekocita, prvo u korij (stadij 1), a zatim i u amnij (stadij 2) te kasnije dolazi i do nekroze amnijskog epitela (stadij 3) (7,83,84). Neutrofili su majčinog podrijetla, dok su oni u pupkovini i fetalnim krvnim žilama (kod funisitisa) fetalnog porijekla (7,82). Bakterijska invazija amnijske šupljine uzrokuje jak upalni odgovor i dramatičan porast proinflamatornih citokina poput IL-1, TNF-alfa, IL-6, iL-8 i CXCL6, kao i invaziju neutrofila. Analiza plodove vode kod koriamnionitisa pokazala je promjene u sastavu proteina. Tako imamo povećanu količinu MMP, neutrofilnih elastaza koje sudjeluju kod PPO-a, kao i povećanje količine antimikrobnih proteina

poput laktoferina, kalgranulina ili alarmina (7,34,83,84). Kao najbolji prediktori ishoda trudnoće i neonatalnih komplikacija u prijevremenim porodima sa i bez PPPPO do sada su se pokazale koncentracije MMP-8 i IL-6 (20,77,82). One ukazuju na povećani rizik oštećenja mozga novorođenčeta i posljedičnu cerebralnu klijenut. Da bi neutrofili migrirali u tivo potrebni su kemotaktički signali. To radi IL-8, poznat i kao peptid koji aktivira neutrofile, i CXCL6, protein koji kemotaktički djeluje na granulocite. Povišena razina intraamnijskih kemokina privlači neutrofile, a stanice pod stresom ili stanična smrt mogu inducirati takozvanu sterilnu upalu. Za takvu dijagnozu potrebno je napraviti amniocentezu. Novije studije sugeriraju da se intraamnijska upala koja je povezana s PP događa i bez dokazivih mikroorganizama i da može biti i sterilna, a čak do 60% sterilnih intraamnijskih upala povezano je s korioamnionitisom (5,6). Takva je sterilna upala češća od mikrobijalne kod pacijentica s prijevremenim porodom s i bez PPPPO. PCR metode određivanja bakterijskog genoma i duboko sekvencioniranje možda će promijeniti to shvaćanje. Bakterijska invazija nije ista kod terminskog prsnuća vodenjaka i prijevremenog poroda. Smatra se da kod terminskog prsnuća vodenjaka infekcija može nastati propagacijom vaginalnog bioma prilikom pregleda prstima, no količina bakterija koja se tim putem proširi u amnijsku šupljinu nije baš velika. Kod prijevremenog poroda, posebice kod PPPPO, smatra se da je količina bakterija u plodovoj vodi kronično visoka te je i postotak infekcija fetusa i neonatalnih sepsi puno viši (5,7,21,62,77,85).

## 1.9. PREDTERMINSKO PRIJEVREMENO PRSNUĆE PLODOVIH OVOJA

### 1.9.1. Definicija i incidencija

Predterminsko prijevremeno prsnuće plodovih ovoja (PPPPO) nastaje prije 37. tjedna trudnoće i prije pojave trudova. Javlja se u 2-8% svih trudnoća, i u 7–20% višeplodovih (blizanačkih) trudnoća (5,46,62,86,87). Zbog toga je pravodobno i točno postavljanje dijagnoze prijevremenog prsnuća plodovih ovoja od iznimne važnosti za ishod trudnoće. U slučaju pozitivne anamneze prsnuća plodovih ovoja standardni dijagnostički postupak podrazumijeva pregled u spekulima, pri kojem bi se trebalo vidjeti kako plodova voda otječe niz stražnji svod rodnice. U takvim slučajevima dodatno testiranje nije potrebno, a ultrazvučna potvrda smanjenja količine plodove vode i oligohidramnij može potvrditi dijagnozu. Opisano kliničko postavljanje dijagnoze razmjerno je jednostavno kada se jasno vidi otjecanje vodenaste tekućine niz stražnji svod rodnice.

### 1.9.2. Dijagnoza

Postavljanje dijagnoze prijevremenog prsnuća plodovih ovoja teže je u slučajevima slabijeg ili povremenog otjecanja plodove vode, a ultrazvučni nalaz pokazuje normalan do niži indeks plodove vode (engl. AFI – *amnionic fluid index*). Nitrazinski test u svijetu je najrašireniji "*klasični*" dijagnostički test. Test otkriva promjenu pH vrijednosti iscjetka rodnice. Prema dostupnoj literaturi osjetljivost metode kreće se u rasponu 90 - 97%. Poznato je kako upala vrata maternice, rodnice, te onečišćenje sjemenom tekućinom, krvlju ili mokraćom dovode do lažno pozitivnih rezultata. U Hrvatskoj nitrazinski test zbog svojih ograničenja nikad nije bio u široj primjeni (86). Od ostalih testova primjenjivao se i Fern test kojim se utvrđuje mikroskopska kristalizacija osušenog iscjetka rodnice. Primijenjen sam ili u kombinaciji s pregledom u spekulima, pokazao je osjetljivost u rasponu od 51 - 98%, a specifičnost u rasponu od 70 - 88%. Neoprezna manipulacija predmetnim stakalcem (otisci prstiju), ali i onečišćenje sjemenom tekućinom i sluzi vrata maternice, uzroci su lažno pozitivnih nalaza. Upotreba suhih pamučnih jastučića kod uzimanja uzorka ili onečišćenje krvlju uzroci su lažno negativnih nalaza (86). Sljedeći test je Kittrichov test. Zasniva se na mikroskopskoj analizi uzorka iscjetka rodnice s ciljem traganja za odljuštenim fetalnim stanicama kože pomoću nilskog plavila. Tom se citokemijskom reakcijom neutralni lipidi boje narančasto te su i stanice nazvane narančastim stanicama, a predloženi su i drugi nazivi - masne stanice, poligonalne stanice, fetalne skvame i

lipidne stanice. Pouzdanost ovog testa za postavljanje dijagnoze prijevremenog prsnuća plodovih ovoja djelomično je zadovoljavajuća u terminskih trudnoća, ali je potpuno nezadovaljavajuća u trudnoća prije termina (86). Svaka od spomenutih metoda ima ograničenja u smislu dijagnostičke pouzdanosti, troškovne učinkovitosti i tehničkih zahtjeva vezanih uz njihovo izvođenje. Važno je uočiti i kako svi navedeni postupci progresivno gube na točnosti s vremenom proteklim od prsnuća plodovih ovoja. Postoje i biokemijski testovi koji se temelje na prepoznavanju pojedinih biokemijskih biljega plodove vode u iscjetku rodnice. Klinički je ispitivan cijeli niz takvih biljega kao što su alfa fetoprotein (AFP), fetalni fibronektin (fFN), IGFBP-1, prolaktin, diamin oksidaza, β HCG i alfa 1 mikroglobulin posteljice (PAMG-1)(86). Intraamnijska infekcija uz mikrobijalnu invaziju amnijske šupljine učestala je pojava i uglavnom dovodi do histološkog korioamnionitisa te upalnog odgovora majke ali i fetusa (6,77,82).

### 1.9.3. Podjela PPPPO

Prema gestacijskoj dobi PPPPO dijelimo na rani, koji nastaje prije 34. tjedna, i kasni između 34. - 37.og tjedna. Kasni je češći i predmet je ovog istraživanja. Kasni PPPPO ima nešto manje teških fetalnih komplikacija, no zbog česte pojave plućnog distresa i sepse ipak predstavlja velik javnozdravstveni problem. Otprilike 15 - 25% kasnih PPPPO komplicirano je klinički evidentnom intraamnijskom infekcijom (88), a incidencija je veća u ranijoj gestacijskoj dobi (89,90). Abrupcija posteljice komplicira 2 - 5% trudnoća s PPPPO (91,92). Postupanje kod PPPPO-a ovisi o gestacijskoj dobi, prisutnosti komplikacija kao što su klinička infekcija, abrupcija posteljice, trudovi ili nesigurno stanje djeteta (93,94). Često se događa bez prepoznatih i evidentnih rizika. Ono što u značajnoj mjeri pridonosi nastanku PPPPO je isto zbivanje u prethodnoj trudnoći, skraćena dužina cerviksa, krvarenje, smanjen indeks tjelesne mase, nizak socioekonomski status, pušenje i korištenje droga. Bez obzira na kliničke manifestacije i opstetričke postupke, u polovice trudnica porod nastupi unutar jednog tjedna od nastanka rupture (95). Danas se PPPPO smatra bolešću plodovih ovoja i posebnim entitetom u odnosu na spontani prijevremeni porod. Oko 70% slučajeva PPPPO može se povezati s intraamnijskom infekcijom, no upitno je je li infekcija uzrok ili posljedica. Najnovija istraživanja pokazala su da ustanovljena koncentracija bakterijskih toksina nije dovoljna da izazove efekt na plodovim ovojima, kao i da bakterijski enzimi, koji inače razaraju kolagenski matriks, nisu specifični za ljudski kolagen. Bakterije koje ne proizvode proteaze mogu također izazvati intraamnijsku infekciju i PPPPO. PPPPO bi prema novijim saznanjima mogao biti povezan sa sterilnom upalom plodovih ovoja

koja oponaša infekciju, tako da bakterijska infekcija vjerojatno nastaje sekundarno. Jedan od važnih čimbenika u nastanku PPPPO je i oksidativni stres koji nastaje stvaranjem slobodnih radikala kisika (ROS). Rizični faktor koji potiče stvaranje ROS je pušenje. Kolagen je primarna meta slobodnih radikala koji aktiviraju kolagenolitičke enzime u plodovim ovojima. MMP9 i drugi proupalni biljezi mogu se inhibirati upotrebom antioksidansa N-acetilcisteina (NAC), što dokazuje da su oksidativni stres i upala glavni čimbenici povezani s PPPPO. Razaranje ekstracelularnog matriksa bogatog kolagenom, koji spaja amnij i korij u plodovim ovojima, jedan je od najvažnijih preduvjeta koji dovode do PPPPO. Tim procesom upravlja nekoliko matriksmetaloproteinaza. Njihovu aktivnost inače reguliraju TIMP. Ravnoteža sustava MMP/TIMP u plodovim ovojima igra ključnu ulogu i u normalnom porodu i u onom s PPPPO. Premda još nije potpuno jasno kako se ona poremeti, jasno je da proteaze, koje u suradnji s infekcijom ili upalom aktiviraju MMP u plodovim ovojima, dovode do slabljenja kolagena i time do rupture plodovih ovoja (20,46,96). Već više od desetljeća poznato je i da apoptoza ima ulogu u PPPPO jer je dokazano da se elementi apoptoze više nalaze u ovojima iz PPPPO nego iz SPP (5). No apoptoza vjerojatno nije glavni mehanizam koji dovodi do PPPPO, nego je samo dio priče u kojoj posrednici upale mogu dovesti do smrti stanica različitim mehanizmima (5). U novije vrijeme istraživanjem ROS i oksidativnog stresa ustanovljeno je da se F2 isoprostan (F2-Isop), produkt peroksidacije lipida i biomarker oksidativnog stresa, nalazi u većoj količini kod PPO nego SPP (2,3). Također je dokazano i da su telomere, koje su marker starenja, ali i količine oksidativnog stresa, u DNK stanica plodovih ovoja i fetalnih leukocita iz pupkovine žena s PPPPO, značajno kraće od onih sa SPP. To nam govori da su prijevremi porodi s PPPPO i SSP vjerojatno dva različita nozološka entiteta. Jednaka duljina telomera kao kod PPPPO nalazi se i u terminskom porodu bez PPO što znači da je količina oksidativnog stresa podjednaka u prijevremenom porodu s PPPPO i terminskom urednom porodu (2–4). To znači da je kod PPPPO došlo do preuranjenog starenja stanica u ekstracelularnom matriksu plodovih ovoja zbog pojačanog oksidativnog stresa. Smatra se da kod prijevremenog poroda kompliciranog PPPPO zbog niza rizičnih faktora, posebice pušenja, abuzusa alkohola i droga te infekcije, loše ishrane ili niskog i previsokog BMI dolazi do pojačanog oksidativnog stresa i posljedičnog starenja stanica. Postoji još nekoliko markera oksidativnog stresa i starenja. Jedan od njih je p38 mitogenom aktivirana protein kinaza (p38MAPK). Njene četiri izoforme aktiviranjem određenih procesa dovode do starenja stanica koje zatim oštećuje i okolne stanice. Razina p38MAPK povišena je i u PPPO i kod terminskog poroda, no u SPP je značajno niža. Sve to ukazuje na mogućnost da starenje tkiva (*senescence*) dovodi do sterilne upale u stanicama plodovih ovoja što posljedično dovodi do sve većeg oštećenja okolnog tkiva te početka terminskog poroda, ali

vjerojatno i prijevremonog poroda s PPPPO premda za to još nema čvrstih dokaza (6,97). No, skraćenje telomera, povišena razina p38MAPK, povišen oksidativni stres uz smanjeni antioksidativni kapacitet i pojačana aktivnost MMP kod PPPPO i terminskog poroda u odnosu na SPP, govori u prilog teoriji starenja stanica plodovih ovoja kao najvjerojatnijem uzroku i terminskog poroda i PPPPO (6,97). Istraživanjem plodovih ovoja kod PPPPO elektronskim mikroskopom nađene su i veće mikrofrakture kroz koje je moguće ascediranje infekcije ili mikroskopsko curenje plodove vode. Premda te mikrofrakture postoje i kod urednih trudnoća i vjerojatno su mjesto pregradnje tkiva, kod PPPPO su brojnije i šire te uz sve navedene čimbenike i one igraju ulogu u patogenezi prsnuća plodovih ovoja (5). Daljnja istraživanja navedenih markera, kao i ovo naše istraživanje, moglo bi pomoći razumijevanju zbivanja koja dovode do PPPPO i nalaženja biomarkera kojima bismo mogli predvidjeti koje će trudnice imati povećanu sklonost PPPPO (98,99).

### 1.9.4. Postupak kod PPPPO-a

Postupak kod preranog prsnuća plodovih ovoja prije termina strogo je individualiziran. Ovisi o gestacijskoj dobi, majčinskim, fetalnim i neonatalnim rizicima. Komplikacije PPPPO dijele se na majčinske i fetalne. U majčinske spadaju abrupcija posteljice te, ukoliko se već nije razvio, sindrom intraamnjiske infekcije. Najčešća fetalna komplikacija je prolaps pupkovine ili sitnih česti. Novorođenački mortalitet iz ovih trudnoća je 40 puta veći u usporedbi s terminskim trudnoćama. Povećan je rizik za neonatalne komplikacije kao što su cerebralna klijenut, kronične respiracijske bolesti, sljepoća i nagluhost. Dugoročno, djeca iz ovih trudnoća imaju problema u kasnijem neuromotornom i psihičkom razvoju. Za razliku od terminskog prsnuća plodovih ovoja za koje postoji konsenzus aktivnog postupka i poticanja trudova, kod PPPPO se može postupati ekspetativno u slučaju da nema znakova infekcije ili fetalnog distresa. Kod ekspetativnog stava bitno je što prije prepoznati znakove infekcije, posebice korioamnionitisa, mjerenjem temperature, redovitim provjeravanjem krvne slike, amniocentezom, ali i ultrazvučnim i CTG monitoriranjem zbog mogućeg fetalnog distresa ili zastoja u rastu. Metode ubrzanja sazrijevanja fetalnih pluća, sprečavanja razvoja intraamnijske infekcije, sprečavanja nastanka trudova te moguća neuroprotekcija novorođenčeta glavne su odrednice liječenja. Gestacijski okvir u kojem se trenutno preporučuje davanje kortikosteroidne profilakse je od 24 - $33^{+6/7}$ tjedana trudnoće. S trudnicama u kojih nastupi PPPPO u dobi 22 - $23^{+6/7}$ treba obaviti razgovor te im objasniti sve posljedice rađanja u ovoj gestacijskoj dobi. Davanje kortikosteroida za sazrijevanje fetalnih pluća kod PPPPO nije pokazalo da se povećava rizik od infekcije bez obzira na gestacijsku dob

(93,100). Cochrane metaanaliza također preporučuje jednokratno davanje kortikosteroida, bez obzira je li došlo do prsnuća ovoja, kod svih prijetećih prijevremenih poroda do 34. tjedna (101). Što se tiče profilaktičkog davanja antibiotika širokog spektra, dokazano je da to prolongira trudnoću, smanjuje učestalost majčinskih i neonatalnih infekcija i smanjuje morbiditet nvorođenčadi zbog nedonošenosti. Premda postoje različite sheme, danas se preporuča da se započne s intravenskim davanjem ampicilina ili eritromicina, a nakon toga nastavi peroralno davanje kombinacije amoksicilina i eritromicina u trajanju od sedam dana. Ne preporuča se davanje kombinacije amoksicilina i klavulanske kiseline zbog povišenog rizika nekrotizirajućeg enterokolitisa novorođenčadi. U slučaju da je trudnica alergična na penicilin preporučeno je davanje eritromicina (100,102). U žena s PPPPO treba ponuditi peroralno eritromicin u dozi od 250 mg četiri puta na dan maksimalno 10 dana ili dok se ne pojave spontani trudovi. U trudnica koje ne mogu tolerirati eritromicin, ili je on kontraindiciran, treba razmotriti peroralnu primjenu penicilina tijekom 10 dana ili do pojave spontanih trudova. Metaanalize su pokazale da korištenje tokolize kod PPPPO nije preporučljivo zbog visokog rizika prikrivanja korioamnionitisa u trudnoćama manjim od 34 tjedna. Korištenje tokolitika i odgoda poroda ne poboljšava perinatalni ishod (103). Preporuča se davanje magnezijevog sulfata kao neuroprofilakse između 24. i 32. tjedna premda još postoje prijepori o dozaži (93). Primjena magnezijeva sulfata u kontekstu neuroprotekcije obuhvaća prije svega precizno određivanje gestacijske dobi. U gestacijskoj dobi i od 24 - $29^{+6/7}$ treba trudnici ponuditi magnezij sulfat, a razmotriti ga u dobi od 30- $33^{+6/7}$ kao i u dobi 23 - $23^{+6/7}$ (93).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

Cilj istraživanja je dobiti dodatne spoznaje o mehanizmu nastanka prijevremenog prsnuća plodovih ovoja u nedonošenim trudnoćama te o postojanju različitih molekularnih mehanizama kojima upala posteljice i plodovih ovoja izaziva PPPPO.

Glavni cilj istraživanja jest ispitati postoji li povezanost imunohistokemijske ekspresije IL-6 i prisutnosti RECK proteina u plodovim ovojima trudnica s i bez prijevremenog prsnuća plodovih ovoja u kasnim nedonošenim trudnoćama. Posebna pozornost će se obratiti na prisutnost IL-6 i RECK proteina u odnosu na postojanje patohistoloških znakova infekcije posteljice i plodovih ovoja.

Hipoteze:

1. U plodovim ovojima kasnih nedonošenih trudnoća postoji imunohistokemijska izražajnost RECK proteina i IL-6.
2. Očekuje se da u skupini trudnica s dokazanim korioamnionitisom i prijevremenim prsnućem plodnih ovoja imunohistokemijska izražajnost RECK proteina bude smanjena u odnosu na skupinu s kasnim spontanim prijevremenim porođajem bez korioamnionitisa.
3. Očekuje se da u skupini trudnica s dokazanim korioamnionitisom i prijevremenim prsnućem plodnih ovoja imunohistokemijska izražajnost IL-6 bude povećana u odnosu na skupinu s kasnim spontanim prijevremenim porođajem bez korioamnionitisa.

# 3. ISPITANICE, MATERIJALI I METODE ISTAŽIVANJA

## 3.1. ISPITANICE I MATERIJALI ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je provedeno na Klinici za ženske bolesti i porode i Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split. Prospektivno je, nerandomizirano, a prema specifičnom ustroju ima karakteristike presječnog, longitudinalnog istraživanja, a odobrilo ga je Etičko povjerenstvo KBC Split. Istraživanje je s obzirom na svrhu temeljno, a prema pristupu eksperimentalno. S obzirom da ne uključuje operativni zahvat na ispitanicima istraživanje nije intervencijsko, ali jest opservacijsko jer uključuje raščlambu aktivnosti IL-6 i RECK proteina u plodovim ovojima.

U istraživanje su bile uključene trudnice koje su rodile u periodu kasnog prijevremenog porođaja (navršena 34 do 36 +6/7 tjedana trudnoće). Temeljem osnovne podjele prijevremenog porođaja ispitanice su inicijalno podijeljene u dvije skupine:

a) trideset trudnica s prijevremenim prsnćem vodenjaka prije termina uz patohistološke znakove korioamnionitisa

b) trideset trudnica sa spontanim prijevremenim porođajem bez patohistoloških znakova korioamnionitisa.

U istraživanje smo tijekom studije uključili i dodatnu (treću) skupinu od 30 trudnica s kasnim spontanim prijevremenim porođajem i dokazanim korioamnionitisom.

Histološki korioamnionitis je definiran literaturno određenim kriterijima prisutnosti akutnih upalnih promjena u plodovim ovojima tj. fetalnim membranama (83).

Dob trudnoće je računata prema podatku o prvom danu zadnje menstruacije uz korekciju ukoliko se ultrazvučnim pregledom u prvom tromjesečju razlikovala za više od tjedan dana.

Iz istraživanja su bile isključene trudnice s ranom preeklampsijom, višeplodnim trudnoćama, polihidramnijem, gestacijskim dijabetesom, urođenim nakaznostima i usporenjem rasta ploda, kolestazom te one u kojih je porod induciran zbog majčinskih i/ili fetalnih razloga. Za dijagnostičke kriterije preeklampsije, gestacijskog dijabetesa, polihidramnija, usporenja rasta ploda i kolestaze korištene su preporuke i definicije međunarodnih udruženja prilagođene lokalnim osobitostima, poglavito u slučaju porodne mase.

U istraživanje nisu bile uključene one trudnice u kojih je korištena kortikosteroidna profilaksa ili inhibitori sinteze prostaglandina tijekom trudnoće.

Ispitanice iz jedne skupine bile su antropometrijski ujednačene s onima iz druge skupine po dobi, tjelesnoj masi, indeksu tjelesne mase i paritetu, kako bi se izbjegle očekivane pogreške ponajprije radi tjelesne mase, broja poroda i životne dobi.
Rezultati istraživanja bili su imunohistokemijska ekspresija IL-6 te RECK proteina u plodovim ovojima trudnica s i bez prijevemenog prsnuća vodenjaka u kasnim nedonošenim trudnoćama. Mjera istraživanja bila je stupanj imunohistokemijske ekspresije RECK proteina i IL-6 te relativna kvantifikacija tj. relativna promjena u njihovoj imunohistokemijskoj ekspresiji u citoplazmi stanica plodovih ovoja.

## 3.2. METODE ISTRAŽIVANJA

### 3.2.1. Patohistološki pregled plodovih ovoja

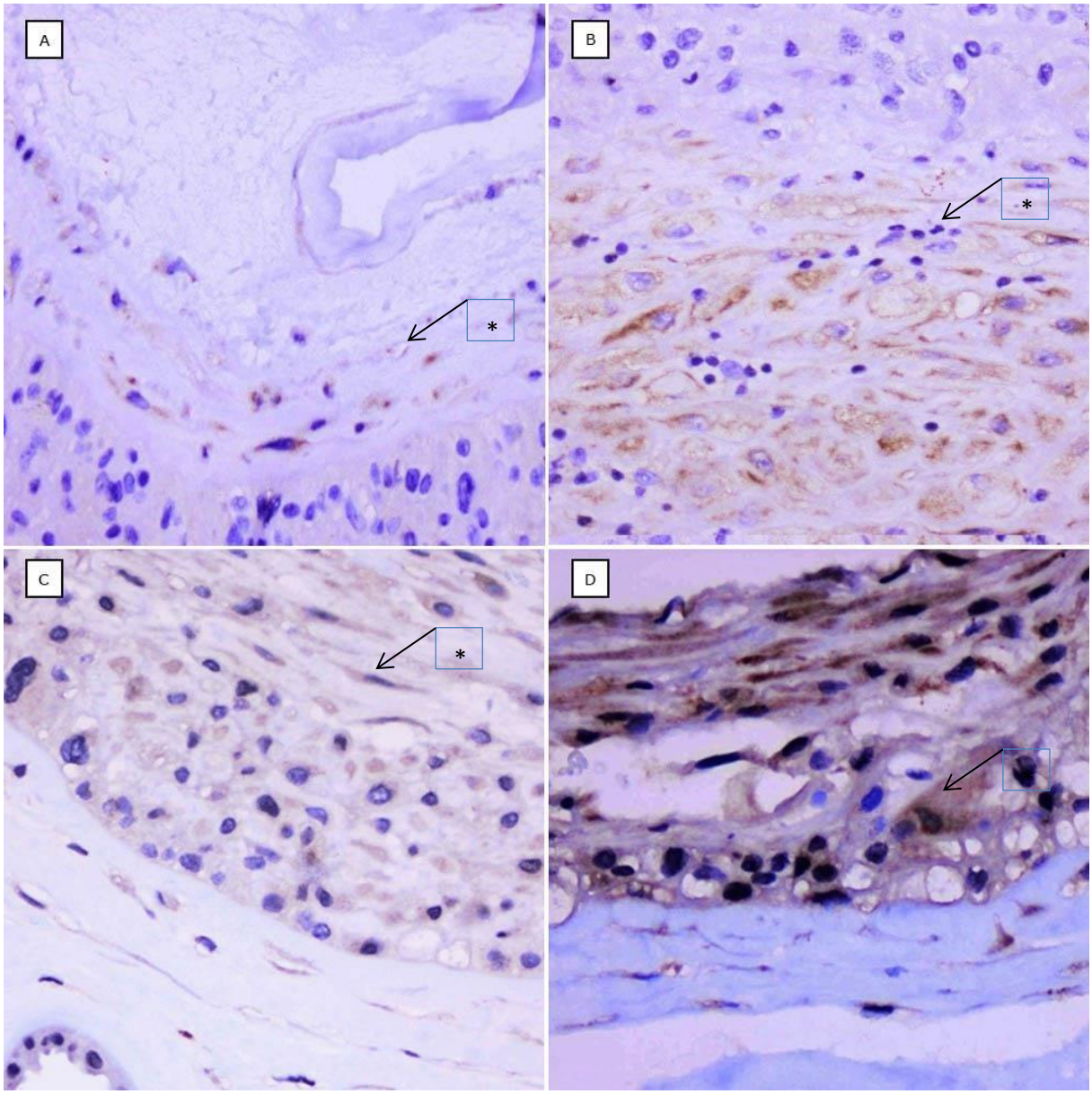
Nakon porođaja uzimalo se 1 $cm^2$ tkiva fetalnih membrana s mjesta rupture plodovih ovoja, pohranilo te dostavilo u Imunohistokemijski laboratorij Zavoda za patologiju i sudsku medicinu KBC Split. Po prijemu se fiksiralo 24 sata u 4% puferiranom formalinu. Nakon fiksacije i obrade preparati su se uklapali u parafin. Parafinski blokovi rezani su u rezove debljine 3-5 μm, a zatim bojani standardnom metodom hemalaun eozina. Za patohistološki kriterij korioamnionitisa korišteni su standardizirani kriteriji (7,83).
Mikroskopski pregled preparata obavljao se svjetlosnim mikroskopom Olympus BX 41 (Olympus, Tokio, Japan) uz povećanje od 40 puta.
Svi uzorci bili su pregledani od strane dva patologa specijalizirana za ginekološku opstetričku patologiju u cilju objektivnosti rezultata. Ukoliko se rezultati pregleda nisu podudarali, preparat je bio isključen iz istraživanja.

### 3.2.2. Imunohistokemijska metoda

Imunohistokemija (IHK) se radila pomoću DAKO autobojača (Dako, Glostrup, Denmark). Koristila su se monoklonalna antitijela za RECK protein kao primarna antitijela (Abgent, San Diego, CA) razrijeđena 1:50 i primarna monoklonalna antitijela za IL-6 (Leica, Wetzler, Germany) razrijeđena 1:50 s Dako razrjeđivačem za antitijela (Dako). Kao sekundarna antitijela koristila su se Universal Antibody (LSAB; Dako). Preparati za određivanje IL-6 zagrijavali su se zatim u puferu pH 9 (Dako) u mikrovalnoj peći snage 900 W kroz 10 minuta, a nakon toga još 10 minuta na 300 W. Preparati za određivanje RECK proteina tretirali su se na isti način samo

uz malo duže zagrijavanje, 10 minuta na 900 W i 35 minuta na 300 W. Nakon hlađenja preparata slijedilo je ispiranje u destiliranoj vodi i otopini fosfatnog pufera (PBS) (Ventana, Tuscon, AZ). Daljnja obrada vršila se u automatskom bojaču (DAKO, Danska), a sastojala se od tretiranja preparata 3% otopinom vodikova peroksida (Dako) kroz 15 minuta za blokiranje endogene peroksidaze i opet ispiranja otopinom PBS-a. Zatim je slijedila inkubacija u tamnoj komori na sobnoj temperaturi 30 minuta s IL-6 i RECK antitijelima. Nakon toga uzorci su ispirani s PBS-om i inkubirani 15 minuta s LINK (EnVision; Dako) i 15 minuta sa streptavidinom (EnVision). Nakon još jednog ispiranja PBSom, preparati su se inkubirali s kromogen diaminobenzidinom (Dako) u autobojaču (Dako) 15 minuta. Zatim su se kontrastno bojali hematoksilinom (Dako), dehidrirani kroz gradijent alkohola, očiščeni s xylenom i prekriveni s kanada balzamom i pokrovnim stakalcima (Dako).

Intenzitet anti-RECK i IL-6 bojanja kategorizirao se kao stupanj obojenosti citoplazme i to:
0, ne detektira se; 1, slabo; 2, jako, a prema protokolu Scheller i suradnika (104)(Slika 6.).




Slika 6. Imunohistokemijska ekspresija (*) IL-6 (A-slaba, B-jaka) i RECK proteina (C-slaba, D-jaka) u plodnim ovojima (povećanje 40 X)

### 3.2.3. Statističke metode

Kliničke i antropometrijske varijable prikazane su brojčanim podacima prikazanim tablično te srednjim vrijednostima ± standardna devijacija (SD).

Za usporedbu distribucija kvalitativnih varijabli između ispitivanih skupina uporabljen je $\chi^2$ test ili Fischerov egzaktni test. Ukoliko su kvantitativne vrijednosti varijabli imale normalnu distribuciju, za usporedbu skupina koristio se ANOVA test. Za statističku obradu korišten je računalni program Statistica 17.0 (SPSS Chicago, IL). Snaga istraživanja jest na 80%. Rezultati su interpretirani na razini statističke značajnosti $p<0,05$.

# 4. REZULTATI

U Klinici za ženske bolesti i porode KBC Split poštujući kriterije uključenja i isključenja iz studije, prikupljeni su plodovi ovoji, a obrada i analiza istih učinjena je na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split.

## 4.1. Demografska i laboratorijska obilježja ispitivanih skupina

U Tablici 1. prikazali smo demografska i laboratorijska obilježja ispitanica, a grupirane su u tri skupine; PPPPO uz histološki dokazani korioamnionitis te dvije skupine sa spontanim prijevremenim porodom s i bez histološki dokazanog korioamnionitisa.

Tablica 1. Demografska i laboratorijska obilježja skupine kasnih spontanih prijevremnih poroda s i bez korioamnionitisa i PPPPO.

| **Varijable** | **PPPPO uz korioamnionitis (n=30)** | **SPP uz korioamnionitis (n=30)** | **SPP bez korioamnionitisa (n=30)** | ***p*-vrijednost** |
|---|---|---|---|---|
| Starost (godine) | 26,83±3,88 | 25,7±4,55 | 27,9±4,17 | *p=0,135 |
| Dob trudnoće (tjedni) | 34,36±0,61 | 34,86 ± 0,81 | 35,33±0,84 | *p>0,05 |
| Paritet | | | | |
| Prvotka | 22 | 19 | 20 | **p=0,7 |
| Višerotka | 8 | 11 | 10 | |
| BMI**(kg/m$^2$) | | | | |
| 18.5 - 24.9 | 5 | 8 | 7 | **p=0,14 |
| 25 - 29.9 | 7 | 10 | 10 | |
| ≥30 | 18 | 12 | 13 | |
| Lekociti u perifernoj krvi (x10$^9$/L) | 27,14±12.31 | 29,34±11,64 | 10,14±7,81 | *p<0.05 |
| CRP (mg/L) | 25,13±16,71 | 28,46±13,29 | 8,21±6,04 | *p<0,05 |

*ANOVA test, **Hi kvadrat test

Kratice:

PPPPO = predterminsko prijevremeno prsnuće plodovih ovoja

SPP = spontani prijevremeni porod

BMI = (eng *Body Mass Index* - indeks tjelesne mase)

U skupini trudnica koje su rodile u gestacijskoj dobi 34-36$^{+6/7}$ te su imale histološke značajke korioamnionitisa uz prijevremeno prsnuće plodnih ovoja prosječna životna dob bila je 26,83±3,88 godina, u skupini koje su imale kasni spontani prijevremeni porod uz znakove histološkog korioamnionitisa prosječna životna dob je bila 25,7±4,55 godina, dok je u skupini koja ja imala kasni spontani prijevremeni porod bez znakove histološkog korioamnionitisa

prosječna životna dob je bila 27,9±4,17 godina. Uporaba ANOVA testa nije pokazala statistički značajnu razliku između promatranih skupina (p=0,135; F=2,04).

U skupini trudnica koje su rodile u gestacijskoj dobi 34-$36^{+6/7}$ te su imale histološke značajke korioamnionitisa uz prijevremeno prsnuće plodovih ovoja, prosječna gestacijska dob bila je 34,36±0,61 tjedana; u skupini onih koje su imale kasni spontani prijevremeni porođaj uz znakove histološkog korioamnionitisa, prosječna gestacijska dob bila je 34,86±0,81 tjedana, dok je u skupini koja je imala kasni spontani prijevremeni porod bez znakova histološkog korioamnionitisa prosječna gestacijska dob bila 35,33±0,84 tjedana. Uporaba ANOVA testa nije pokazala statistički značajnu razliku između promatranih skupina (p>0,05; F=11,93).

U skupini trudnica koje su rodile u gestacijskoj dobi 34-$36^{+6/7}$ te su imale histološke značajke korioamnionitisa uz prijevremeno prsnuće plodovih ovoja bilo je 22 prvorotki i 8 višerotki; u skupini onih koje su imale kasni spontani prijevremeni porod uz znakove histološkog korioamnionitisa bilo je 19 prvorotki i 11 višerotki, dok je u skupini koja je imala kasni spontani prijevremeni porod bez znakove histološkog korioamnionitisa bilo 20 prvorotki i 10 višerotki. Uporaba Hi kvadrat testa nije pokazala razliku u paritetu između promatranih skupina (p=0,7; $\chi^2$=0,712 ).

U skupini trudnica koje su rodile u gestacijskoj dobi 34-$36^{+6/7}$ te su imale histološke značajke korioamnionitisa i prijevremeno prsnuće plodovih ovoja pet je trudnica imalo indeks tjelesne mase od 18,5 – 24,9 kg/$m^2$, sedam od 25 – 29,9 kg/$m^2$, te osamnaest ≥30 kg/$m^2$, u skupini onih koje su imale kasni spontani prijevremeni porod uz znakove histološkog korioamnionitisa, osam trudnica imalo je indeks tjelesne mase od 18,5 – 24,9 kg/$m^2$, deset od 25 – 29,9 kg/$m^2$, a dvanaest ≥30 kg/$m^2$, dok je u skupini koja je imala kasni spontani prijevremeni porod bez znakova histološkog korioamnionitisa sedam trudnica imalo indeks tjelesne mase od 18,5 – 24,9 kg/$m^2$, deset od 25 – 29,9 kg/$m^2$, te trinaest ≥30 kg/$m^2$. Uporaba Hi kvadrat testa nije pokazala razliku u indeksu tjelesne mase između promatranih skupina (p=0,7; $\chi^2$=6,91).

U skupini trudnica koje su rodile u gestacijskoj dobi 34-$36^{+6/7}$ te su imale histološke značajke korioamnionitisa uz prijevremeno prsnuće plodnih ovoja broj leukocita u perifernoj krvi bio je 27,14±12,31, u skupini koja je imala kasni spontani prijevremeni porod uz znakove histološkog korioamnionitisa broj leukocita u perifernoj krvi bio je 29,34±11,64, dok je u skupini koja je imala kasni spontani prijevremeni porod bez znakova histološkog korioamnionitisa broj leukocita u perifernoj krvi bio 10,14±7,81. Uporabom ANOVA testa smo pronašli statistički značajnu razliku u broju leukocita u perifernoj krvi između promatranih skupina (p<0.05; F=13,39).

U skupini trudnica koje su rodile u gestacijskoj dobi 34-$36^{+6/7}$ te su imale histološke značajke korioamnionitisa uz prijevremeno prsnuće plodnih ovoja, vrijednost CRP u perifernoj krvi bila je 25,13±16,71, u skupini koja je imala kasni spontani prijevremeni porod uz znakove histološkog korioamnionitisa CRP je bio 28,46±13,29, dok je u skupini koja je imala kasni spontani prijevremeni porod bez znakova histološkog korioamnionitisa CRP bio 8,21±6,04. Uporabom ANOVA testa pronašli smo statistički značajnu razliku u vrijednosti CRP u perifernoj krvi između promatranih skupina ($p<0,05$; $F=10,09$).

## 4.2. Ekspresija interleukina 6 i RECK proteina u ispitivanim skupinama

U Tablici 2. prikazali smo imunohistokemijsku izražajnost IL-6 te RECK proteina u skupini trudnica koje su rodile u gestacijskoj dobi 34-$36^{+6/7}$, imale histološke značajke korioamnionitisa te prijevremeno prsnuće plodnih ovoja i skupine koja je imala kasni spontani prijevremeni porođaj bez korioamnionitisa. U Tablici 3. prikazali smo imunohistokemijsku ekspresiju IL-6 i RECK proteina u plodovim ovojima kasnih spontanih prijevremenih poroda s i bez korioamnionitisa, a u Tablici 4. imunohistokemijsku ekspresiju IL-6 i RECK u plodovim ovojima spontanih kasnih prijevremenih poroda s korioamnionitisom i PPPPO uz histološki korioamnionitis

Tablica 2. Imunohistokemijska izražajnost IL-6 i RECK proteina u plodovim ovojima kasnih prijevremenih poroda uz korioamnionitis i PPPPO te SPP bez korioamnionitisa

| | **PPPPO uz korioamnionitis (n=30)** | **SPP bez korioamnionitisa (n=30)** | ***p*-vrijednost** |
|---|---|---|---|
| IL-6 | | | |
| Slaba ili nikakva ekspresija | 3 | 1 | *p>0,05 |
| Jaka ekspresija | 27 | 29 | |
| RECK | | | |
| Slaba ili nikakva ekspresija | 18 | 10 | **p=0,04 |
| Jaka ekspresija | 12 | 20 | |

*Fischerov egzaktni test , **Hi kvadrat test

Kratice:

SPP - spontani prijevremeni porod

PPPPO – predterminsko prijevremeno prsnuće plodovih ovoja

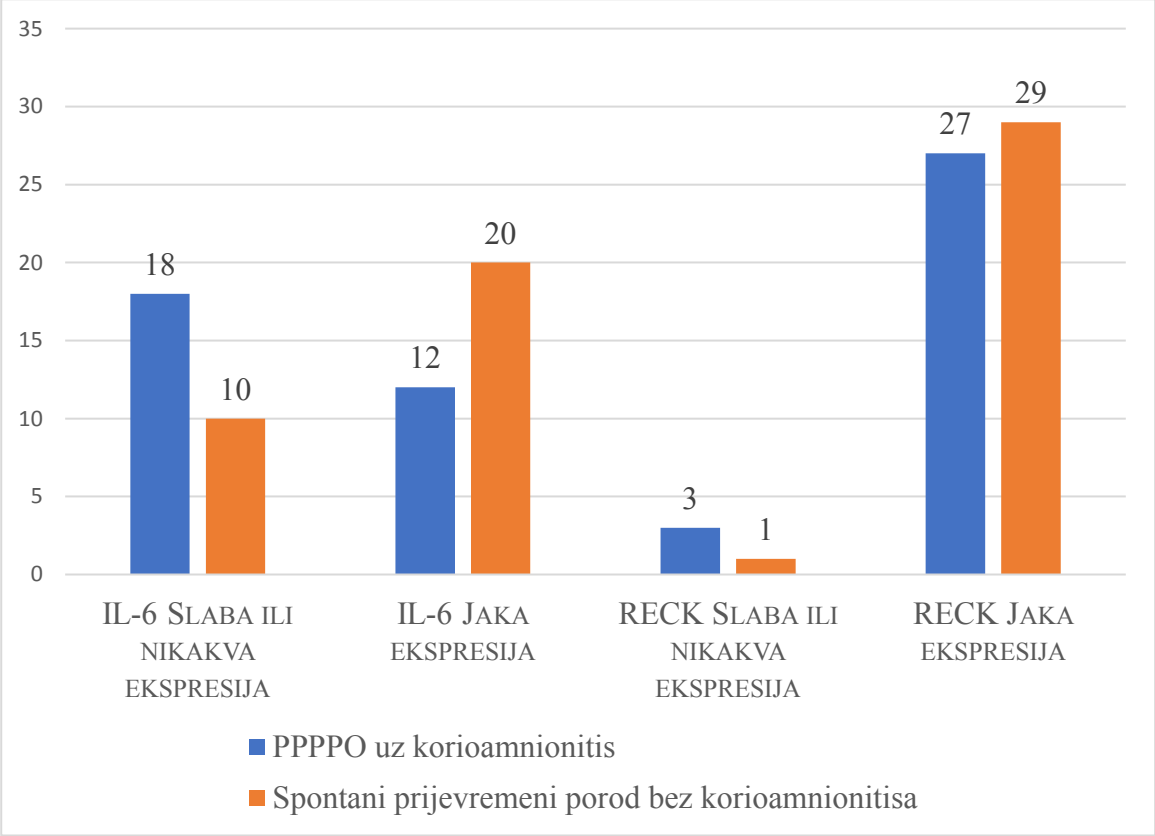
RECK = *Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*

IL-6 = Interleukin-6

U skupini trudnica koje su rodile u gestacijskoj dobi 34-$36^{+6/7}$ te su imale histološke značajke korioamnionitisa te prijevremeno prsnuće plodnih ovoja, tri je imalo slabu ili nikakvu ekspresiju

Interleukina 6, a 27 jaku ekspresiju. U skupini onih koje su imale kasni spontani prijevremeni porod jedna je imala slabu ili nikakvu, a 29 jaku ekspresiju. Uporabom Fischerovog egzaktnog testa nismo pronašli statitistički značajnu razliku u izražajnosti interleukina 6 između promatranih skupina (Fischer test=0.612; p>0,05).

U skupini trudnica koje su rodile u gestacijskoj dobi 34-36$^{+6/7}$ te su imale histološke značajke korioamnionitisa i prijevremeno prsnuće plodnih ovoja, 18 je imalo slabu ili nikakvu, a 12 jaku ekspresiju RECK proteina. U skupini onih koje su imale kasni spontani prijevremeni porod, 10 je imalo slabu ili nikakvu, a 20 jaku ekspresiju. Korištenjem hi kvadrat testa pronašli smo statistički značajnu razliku u izražajnosti RECK proteina ($\chi^2$=4,28; p=0,04).




Dijagram 1. Imunohistokemijska ekspresija IL-6 i RECK proteina u plodovim ovojima kasnih spontanih prijevremenih poroda bez korioamnionitisa i PPPPO uz korioamnionitis.

Tablica 3. Imunohistokemijska ekspresija IL-6 i RECK proteina u plodovim ovojima kasnih spontanih prijevremenih poroda s i bez korioamnionitisa

| | **SPP bez korioamnionitisa (n=30)** | **SPP uz korioamnionitis (n=30)** | ***p*-vrijednost** |
|---|---|---|---|
| IL-6 | | | |
| Slaba ili nikakva ekspresija | 1 | 2 | *p>0,05 |
| Jaka ekspresija | 29 | 28 | |
| RECK | | | |
| Slaba ili nikakva ekspresija | 10 | 21 | **p= 0,004 |
| Jaka ekspresija | 20 | 9 | |

*Fischerov egzaktni test , **Hi kvadrat test

Kratice:

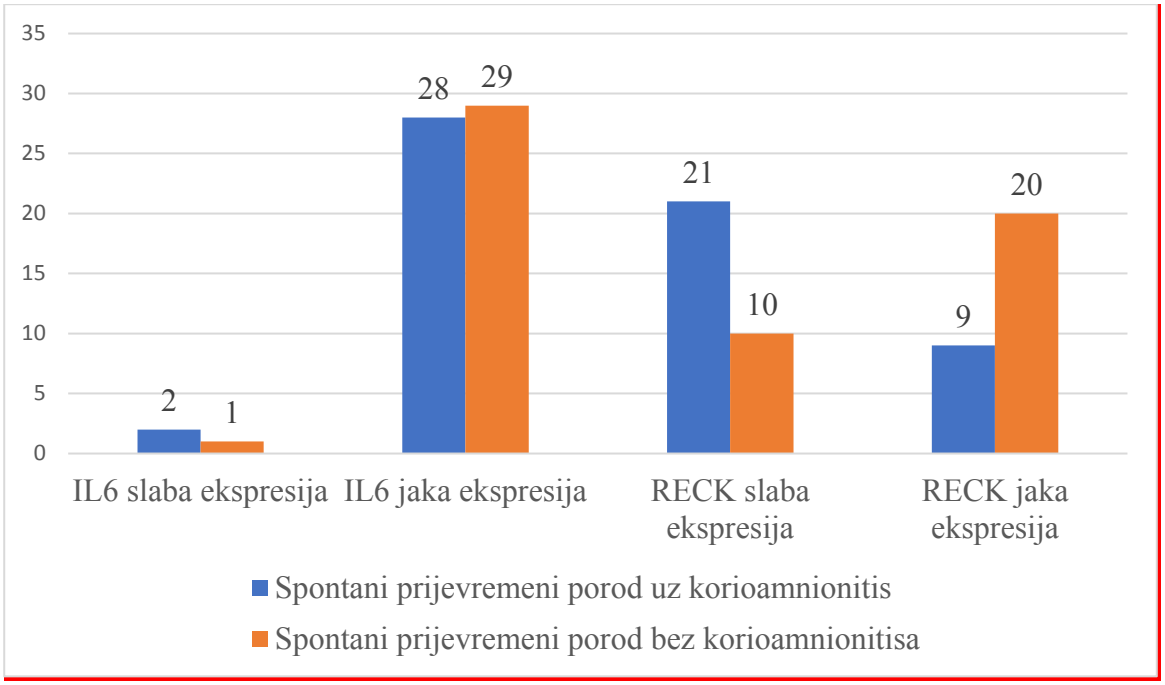
RECK = Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs

IL-6 = Interleukin-6

SPP - Spontani prijevremeni porođaj

U skupini trudnica koje su rodile spontano u gestacijskoj dobi 34-36+6/7 te su imale histološke značajke korioamnionitisa, dvije su imale slabu ili nikakvu ekspresiju interleukina 6, a 28 jaku ekspresiju. U skupini onih koje su imale kasni spontani prijevremeni porod bez histoloških značajki korioamnionitisa, jedna je imala slabu ili nikakvu, a 29 jaku ekspresiju. Uporabom Fischerovog egzaktnog testa nismo pronašli statitistički značajnu razliku u izražajnosti interleukina 6 između promatranih skupina (Fischer test=1; p>0,05)

U skupini trudnica koje su rodile u gestacijskoj dobi 34-$36^{+6/7}$ te su imale histološke značajke korioamnionitisa, 20 je imalo imale slabu ili nikakvu ekspresiju RECK proteina, a 8 jaku ekspresiju. U skupini koja je imala kasni spontani prijevremeni porod bez histoloških značajki korioamnionitisa, 10 je imalo slabu ili nikakvu, a 20 jaku ekspresiju. Korištenjem hi kvadrat testa pronašli smo statistički značajnu razliku u izražajnosti RECK proteina u toj skupini ($\chi^2$=8.075, p=0.004).




Dijagram 2. Imunohistokemijska ekspresija IL-6 i RECK proteina u plodovim ovojima kasnih spontanih prijevremenih poroda s i bez korioamnionitisa.

Tablica 4. Imunohistokemijska ekspresija IL-6 i RECK u plodovim ovojima spontanih kasnih prijevremenih poroda s korioamnionitisom i PPPPO uz histološki korioamnionitis

| | **PPPPO uz korioamnionitis (n=30)** | **SPP uz korioamnionitis (n=30)** | ***p*-vrijednost** |
|---|---|---|---|
| IL-6 | | | |
| Slaba ili nikakva ekspresija | 3 | 2 | *p>0,05 |
| Jaka ekspresija | 27 | 28 | Fischer test=1 |
| RECK | | | |
| Slaba ili nikakva ekspresija | 18 | 21 | **p>0,05 |
| Jaka ekspresija | 12 | 9 | $\chi^2$=0,416 |

*Fischerov egzaktni test , **Hi kvadrat test

Kratice:

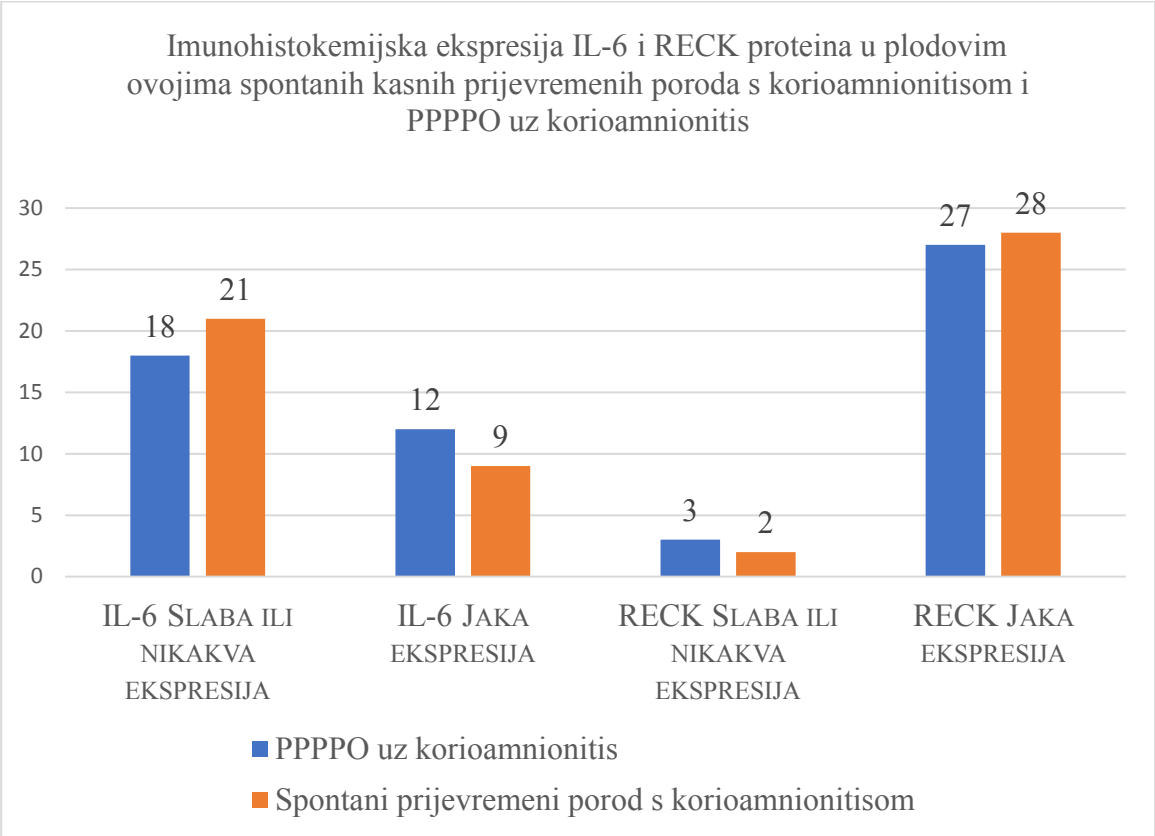
SPP = spontani prijevremeni porod

PPPPO = predterminsko prijevremeno prsnuće plodovih ovoja

RECK = *Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*

IL-6 = Interleukin-6

U skupini trudnica koje su rodile u gestacijskoj dobi 34-36$^{+6/7}$ te su imale histološke značajke korioamnionitisa i prijevremeno prsnuće plodnih ovoja, tri je imalo slabu ili nikakvu ekspresiju interleukina 6, a 27 jaku ekspresiju. U skupini onih koje su imale kasni spontani prijevremeni porod uz histološke znakove korioamnionitisa, dvije su imale slabu ili nikakvu, a 28 jaku ekspresiju. Uporabom Fischerovog egzaktnog testa nismo pronašli statitistički značajnu razliku u izražajnosti interleukina 6 između promatranih skupina (Fischer test=1; p>0,05). U skupini trudnica koje su rodile u gestacijskoj dobi 34-36$^{+6/7}$ te su imale histološke značajke korioamnionitisa te prijevremeno prsnuće plodnih ovoja 18 je imalo slabu ili nikakvu, a 12 jaku ekspresiju RECK proteina. U skupini koje su imale kasni spontani prijevremeni porođaj uz histološke znakove korioamnionitis 21 je imala slabu ili nikakvu, a 9 jaku ekspresiju. Korištenjem hi kvadrat testa nismo pronašli statistički značajnu razliku u izražajnosti RECK proteina ($\chi^2$=0,416; p>0,05).




Dijagram 3. Imunohistokemijska ekspresija IL-6 i RECK proteina u plodovim ovojima spontanih kasnih prijevremenih poroda s korioamnionitisom te PPPPO uz korioamnionitis.

# 5. RASPRAVA

Glavni rezultat našeg istraživanja jest da u plodovim ovojima kasnih prijevremenih poroda postoji imunohistokemijska izražajnost RECK proteina i IL-6. Pojedinačno, imunohistokemijska ekspresija RECK proteina bila je slabije izražena u skupini kasnih nedonošenih trudnoća s histološki dokazanim korioamnionitisom, bez obzira na klinički pojavni oblik prijevremenog poroda tj. s očuvanim plodovim ovojima ili preranim prsnućem plodovh ovoja u odnosu na skupinu s kasnim spontanim prijevremenim porodom bez histoloških značajki korioamnionitisa. Ovakav rezultat je nešto šire tumačenje hipoteze iz prijave teme jer smo kroz istraživanje dobili dodatne podatke koje smo publicirali te smo smatrali da ih je poželjno uklopiti u tekst dizertacije (105,106). Naime u prijavi teme smo se fokusirali na dvije skupine; one s PPPPO uz dokazani histološki korioamnionitis te na trudnice sa SPP bez histološkog korioamnionitisa. Budući da smo kroz istraživanje u znatnom broju trudnica sa SPP pregledom posteljice dokazali korioamnionitis, stvorili smo i treću skupinu trudnica. I u ovoj smo skupini proveli imunohistokemijsko bojanje na RECK protein i IL-6.

Pojedinačna usporedba skupina pokazala je da nismo pronašli razliku u imunohistokemijskoj izražajnosti RECK proteina između skupina s PPPPO i kasnim spontanim prijevremenim porodom te dokazanim korioamnionitisom u obje skupine.

Također nismo pronašli ni razliku u imunohistokemijskoj izražajnosti IL-6 između promatranih skupina, ali za izdvojiti je da je u obje skupine ona bila u visokom postotku jaka.

Značajna karakteristika naše studije strogo je poštivanje kriterija uključenja i isključenja. Nakon toga trudnice smo grupirali u tri skupine: PPPPO uz histološki dokazani korioamnionitis te dvije skupine sa spontanim prijevremenim porodom: s i bez histološki dokazanog korioamnionitisa. Među njima temeljem promatranih sociodemografskih značajki za koje smo smatrali da bi mogle imati utjecaj na istraživane varijable, nije bilo razlike. Kako je prijevremeni porod u svim svojim kliničkim pojavnim oblicima povezan s različitim inačicama hipertenzivne bolesti u trudnoći, a najviše preeklampsijom, mislimo da je naročito značajno to što smo u kriterije isključenja stavili i ovaj poremećaj trudnoće. Dokazano je da aktivnost RECK proteina i MMP regulira invazivnost trofoblasta te razvoj posteljice u ranoj trudnoći (107). Kako je poremećaj invazije trofoblasta povezan s etiopatogenezom rane preeklampsije (eng. *early onset preeclampsia*), ali i drugih poremećaja trudnoće poput usporenja rasta ploda, smatrali smo važnim ovo stanje postaviti kao kriterij isključenja. Također smo isključili sve bolesnice koje su tijekom trudnoće primale kortikosteroidnu profilaksu. Dosadašnja istraživanja pokazala su da kortikosteroidi imaju utjecaj na aktivnost matriksmetaloproteinaza, prvenstveno MMP9, ali ne i RECK proteina (108).

Nismo pronašli podatke o tome postoji li specifičan utjecaj kortikosteroida na učinak i aktivnost MMP2 koja također ostvaruje međudjelovanje s RECK proteinom.

Za ostale promatrane kriterije isključenja nismo u literaturi našli potvrdu imaju li utjecaja na aktivnost RECK proteina, ali smo ih temeljem sličnih studija iz literature smatrali neophodnim. Postoje istraživanja u kojima prije navedena patološka stanja trudnoće također imaju utjecaja na aktivnost IL-6 (109).

Istraživanje ima nekoliko nedostataka. Prvi se nedostatak odnosi na broj ispitanica u istraživanim skupinama koji je relativno malen. Sigurno je da bi uvećanje broja ispitanica povećalo snagu istraživanja. Obrazloženje ovog nedostatka je dosljedno poštivanje kriterija uključenja i isključenja ispitanica u studiju te smatramo da se temeljem toga ovaj nedostatak može prihvatiti. Druga zamjerka odnosi se na korištenje imunohistokemije koja je semikvantitativna metoda procjene i koja je podložna subjektivnosti istraživača. Stupanj objektiviziranosti je postignut na način da je istraživanje bilo slijepo za patologe. Svako stakalce pregledano je dva puta te se u slučaju nepodudarnosti stupnja izražajnosti preparat isključio iz studije. Još jedna moguća zamjerka jest da je stupanj izražajnosti proučavan nakon što su započeli trudovi, a u dostupnoj literaturi nema pouzdanih istraživanja o tome imaju li kontrakcije maternice utjecaja na izražajnost RECK i IL-6 u plodovim ovojima. Već smo naveli da je imunohistokemijska ekspresija RECK proteina bila slabije izražena u skupini kasnih nedonošenih trudnoća s histološki dokazanim korioamnionitisom te preranim prsnućem plodovih ovoja u odnosu na skupinu s kasnim spontanim prijevremenim porodom bez korioamnionitisa.

Dosadašnje su studije potvrdile, u slučaju korioamnionitisa i predterminskog prijevremenog prsnuća plodovih ovoja, da je aktivnost MMP2 i MMP9 pojačana, što dovodi do razgradnje sastavnica izvanstaničnog matriksa, prvenstveno kolagena u plodovim ovojima te njihova pucanja. Također se pojačano razgrađuju i ostale sastavnice plodovih ovoja poput elastina, hijalurona i proteoglikana koje su također dio izvanstaničnog matriksa (20,110).

Nekoliko je mogućih objašnjenja prikazane razlike u imunohistokemijskoj izražajnosti RECK proteina između promatranih skupina. Na osnovu dosadašnjih spoznaja najvjerojatnije je da u slučaju korioamnionitisa i SIAI dolazi do stvaranja čitavog niza proupalnih citokina, kemokina i drugih metabolički aktivnih spojeva koji djeluju autokrino i parakrino. Oni različitim putovima možda smanjuju aktivnost RECK proteina, što s druge strane omogućava aktivnost raznih MMP koje razgrađuju kolagen, a to dovodi do slabljenja i pucanja plodovih ovoja. Način na koji bi korioamnionitis i SIAI mogli utjecati na RECK ekspresiju nije jasan, ali je moguće da je riječ o pojačanoj proizvodnji raznih upalnih citokina poput IL-6. U literaturi se još navode i drugi

intreleukini poputa interleukina 1β (IL-1 β), interleukina 8 (IL-8), čimbenika tumorske nekroze alfa (TNFα), kao i monocitnog keemoatraktantnog proteina 1 (MCP-1) (46,62,87).

Protein RECK ima sposobnost endogene inhibicije djelovanja nekih MMP, a njegova glasnička RNK nalazi se u nizu ljudskih organa, kao i kulturama stanica proizašlih iz njih, međutim u stanicama raka nije ih moguće otkriti. Glavni učinak RECK proteina je inhibicija djelovanja gelatinaza (MMP2 i MMP9) kao i MT-MMP1 (eng. *Membrane type MMP-1*). Njegovo djelovanje povezano je i s angiogenezom te metastaziranjem tumora, a razina izražajnosti RECK gena obrnuto je razmjerna invazivnosti tumora. Produkt RECK gena direktno se veže na MMP2 i MMP9 te smanjuje njihovu proteolitičku aktivnost. Do sada se zna da RECK može onemogućavati djelovanje gelatinaza inhibicijom otpuštanja inaktivnog (pro-MMP9) i aktivnog MMP9 iz stanica, umanjivanjem njihove proteolitičke aktivnosti i odvajanjem MMP od stanične stijenke. Smatra se da RECK inhibira djelovanje MMP2 na posttranskiripcijskoj razini. Zbog svojih strukturnih osobitosti RECK kontrolira aktivnost gelatinaza u uskom području oko stanične membrane, a ima i jedinstvenu ulogu međudjelovanja s matriksmetaloproteinazama povezanim sa staničnom stijenkom. Zaključno, ovo pokazuje da je RECK protein značajan regulator pregradnje izvanstaničnog matriksa, kao i da njegova umanjena aktivnost dovodi do pojačane aktivnosti nekih MMP, a najviše MMP2 i MMP9. U slučajevima korioamnionitisa moguće je da bilo kojim prije navedenim poremetnjama njegove aktivnosti može doći do pojačane učinkovitosti gelatinaza (MMP2 i MMP9) te posljedično razgradnje kolagena, slabljena mehaničke uloge plodovih ovoja i njihova preranog pucanja (22,24–26,111).

Druga hipoteza bila je da ćemo u skupini s histološki dokazanim korioamnionitisom i preranim prsnućem plodovih ovoja prije termina dokazati pojačanu imunohistokemijsku ekspresiju IL-6 u odnosu na skupinu sa spontanim prijevremenim porođajem bez dokazanog korioamnionitisa Nismo dokazali razliku u imunohistokemijskoj uzražajnosti IL-6 između ispitivanih skupina. Očekivali smo razliku u izražajnosti IL-6 između istraživanih skupina jer se u literaturi najčešće ovaj interleukin spominje kao medijator upale i infekcije u slučaju korioamnionitisa (34,82,112). Nekoliko je mogućih objašnjenja zašto tu razliku nismo dokazali. Prva je da aktivnost RECK proteina u plodovim ovojima ne kontrolira IL-6 nego moguće neki od drugih proupalnih čimbenika poput IL-1β, IL-8, monocitnog kemoatraktantnog proteina 1 (MCP-1) ili čimbenika tumorske nekroze α. Dokazano je da je ljudski porod (ročni i prijevremeni) povezan s nizom promjena u proizvodnji parakrinih i autokrinih faktora u plodovim ovojima te posteljici koji su već prije navedeni (IL-6, IL-1β, IL-8 i čimbenik tumorske nekroze alfa (36,82,85). Iako je njihova proizvodnja dokazana u zadnjem tromjesečju fizioloških trudnoća koje završe terminskim porodom, najčešće je proučavana u etiopatogenezi prijevremenog poroda, bez obzira

na njegov pojavni oblik i stupanj nedonošenosti (36). Kad se govori o pojačanoj produkciji prije spomenutih auto i parakrinih faktora, neka pitanja u slučaju prijevremenog poroda još uvijek nisu dobila konačan odgovor. Još uvijek nije sigurno je li porast u proizvodnji auto i parakrinih faktora uzrok ili posljedica aktiviranja zajedničkog puta poroda (30,36). Također, još nije odgovoreno na pitanje omjera u količini proizvodnje ovih čimbenika. Isto tako ne zna se jesu li različiti oblici prijevremnog poroda povezani s različitim kombinacijama citokina. Ne znamo ni mijenja li se omjer produkcije različitih proupalnih citokina u različitim trajanjima nedonošenih trudnoća, tj. ima li neka gestacijska dob svoj biomarker u smislu proupalnih citokina. Konačno, postoje li raznolikosti u proupalnom citokinskom odgovoru s obzirom na druge demografske i socijalne značajke. Posebno je intrigantno pitanje ima li svaka trudnoća i trudnica vlastiti biomarkerski proupalni citokinski profil? Menon i suradnici su tako dokazali da su za indukciju prijevremenog poroda kod čovjekolikih majmuna, za razliku od ljudi, odgovorni IL-1β i TNF-α, ali ne i IL-6 ili IL-8 (46). Drugo objašnjenje krije se u mogućoj dvostrukoj ulozi IL-6. Postoje radovi koji pokazuju dvostruko lice IL-6, tj. da u nekim situacijama upala i infekcija ne rezultiraju povećanjem njegove proizvodnje i/ili učinka (29,30). Interleukin 6 je pleiotropni citokin koji je uključen u mnoštvo bioloških funkcija, uključujući razvoj i aktivaciju urođene i stečene imunosti, regenerativnih procesa, metabolizma, zaštite srca i krvožilja te funkciju živčanog sustava u cijelosti. Tijekom upale i infekcije IL-6 potiče hepatocite da stvaraju proteine akutne faze poput CRP, serumskog amiloida A, fibrinogena i a1-antikimotripsina, dok je proizvodnja fibronektina, albumina i transferina smanjena (29,30,34,96). Ovaj citokin svoje raznolike aktivnosti ostvaruje putem dva signalna puta. To su klasični i trans signalni put. Kod klasičnog puta, IL-6 se veže za transmembranske, istoimene, (IL-6) receptore, dok se u slučaju trans signalnog puta veže za topivu inačicu ovog receptora (*eng. soluble interleukin-6 receptor IL-R6*). Kod klasičnog puta, vezanje IL-6 za istoimeni transmembranski receptor izaziva homodimerizaciju bjelančevine gp130. To dovodi do aktiviranja signalne unutarstanične kaskade tj. puta, koji uključuje janus kinazu (JAK), aktiviranje STAT3 (eng. *signal transducer and activator of transcription factor 3*) i JAK SHP mitogen aktiviranu protein kinazu. Aktiviranje ovog puta rezultira u poticanju ekspresije gena osjetljivih na IL-6 i njihovih bioloških učinaka. Trans signalni put je drugi način kojim IL-6 ostvaruje svoj učinak. Kod ovog puta IL-6 se veže za topivu inačicu IL6 receptora (IL-R6) koja se nalazi u ljudskom serumu. Ova forma IL-6 receptora nema transmembranski i citoplazmatski dio što mu onemogućuje aktiviranje klasičng signalnog puta (29,37,113).

Po dosadašnjim spoznajama vezanje IL-6 za transmembranske receptore i aktivacija klasičnog signalnog puta povezani su s protuupalnim aktivnostima i učincima IL-6, dok je aktivacija trans signalnog puta povezana s proupalnim akcijama ovog citokina (29,30).

Temeljem navedenog, jedno od mogućih objašnjenja rezultata zašto nema razlike u imunohistokemijskoj ekspresiji IL-6 između promatranih skupina jest da se u svakom promatranom podtipu kasnog prijevremenog poroda aktivira drugi signalni put. Moguće je da se u slučaju korioamnionitisa, s i bez PPPPO, aktivira trans signalni put (proupalni učinak), a u slučaju spontanog prijevremenog poroda bez značajki korioamnionitisa možda se aktivira klasični signalni put (protuupalni učinak). Ovako hrabra hipoteza zahtijeva čitav niz dodatnih prospektivnih studija s većim brojem ispitanica te pouzdanijim metodama dokazivanja aktivnosti IL-6 u usporedbi s imunohistokemijom. Ako bi hipoteza bila potvrđena, otvarale bi se možda neke nove farmakološke mogućnosti sprečavanja prijevremenog poroda. Također bi bilo zanimljivo proučiti imaju li ova klinička stanja utjecaja na glikozilaciju osnovnog produkta gena odgovornog za sintezu ljudskog IL-6 koji je mapiran na kromosomu 7p21 (29).

Sljedeće objašnjenje možda se nalazi u činjenici da postoji različitost u citokinskom odgovoru na infekciju različitim mikroorganzimima. Već je dokazano da postoji drugačiji citokinski odgovor plodovih ovoja na podražaj lipopolisaharida iz gram negativnih bakterija od onog na poticanje peptidoglikanskih polisaharida podrijetla gram pozitivnih bakterija (46,114). Postoje literaturni navodi koji pokazuju da svi citokini, nastali u plodovim ovojima nakon poticanja lipopolisaharidima i peptidoglikanskim polisaharidima, nužno ne aktiviraju zajednički put (prijevremenog) poroda (46). Stoga bi jedno od mogućih objašnjenja nepostojanja razlike u imunohistokemijskoj ekspresiji IL-6 između promatranih skupina moglo biti i to da je u skupini s histološki dokazanim korioamnionitisom i prijevremenim prsnućem plodovih ovoja infekcija bila prouzročena mikroroganizmima koji dominantno potiču aktivnost IL-6, a ne drugih citokina (46).

Prijevremeni porod najznačajniji je činitelj perinatalnog morbiditeta i mortaliteta. Najčešće se u literaturi, s obzirom na kliničku sliku, navodi podjela na spontani, jatrogeni te onaj s preranim prsnućem plodovih ovoja. Iako je riječ o jednistvenom nozološkom entitetu, lako je moguće da je riječ o potpuno različitim etiopatogenetskim mehanizmima nastanka ovog stanja (47). Dosadašnja istraživanja potvrdila su da stres, prekomjerno rastezanje uterusa, prestanak imunološke tolerancije fetusa kao semialografta, infekcija (lokalna ili sistemska), starenje decidue kao i bolesti maternicnog vrata mogu biti aktivatori promjena koje dovode do zajedničkog puta poroda (76).

Zajednički put poroda obuhvaća promjene u plodovim ovojima, miometriju te maternicnom vratu koje trebaju biti istovremene i usklađene kako bi rezultirale uspješnim i funkcionalnim trudovima (47). Prerano prsnuće plodovih ovoja, kao jedan od kliničkih oblika, javlja se u 4-5% svih te u 40-50% prijevremenih poroda (47).

Najznačajnija uloga plodovih ovoja je da štite fetus tijekom rasta i razvoja. Tu ulogu ostvaruju putem imunološke, građevne, endokrine i mehaničke funkcije. Plodovi ovoji sastoje se od pet slojeva stanica amnija i tri sloja stanica korija. Povezuje ih izvanstanični matriks koji je bogat različitim vrstama kolagena koje daju strukturalnu potporu amniju i koriju. Amnij je u stalnom kontaktu s plodovom vodom i prvi reagira na promjene u njenom sastavu i/ili metaboličkoj i biokemijskoj aktivnosti. S druge strane, korij je u kontaktu s deciduom i smatra se da je barem dijelom odgovoran za očuvanje imunološke tolerancije fetusa koji je semialogeni graft.

Amnij je građen od pet slojeva stanica avaskularnog amnija; amnijskog epitela, bazalne membrane, kompaktnog i spužvastog sloja te sloja stanica fibroblasta. Iako je korion deblji, amnij se smatra odgovornim za čvrstoću plodovih ovoja (5,115). Amnijske epitelijalne stanice čini jedan red kuboidnih stanica koje su međusobno povezane s *gap junctions*. Ove stanice imaju sposobnost stvaranja i lučenja kolagena tipa III i IV, te drugih glikoproteina koji zajedno tvore bazalnu membranu s njihove bazalne strane. Fibroblasti u stromalnom dijelu stvaraju kolagen tipa I i III koji čini kompaktni sloj. Fibroblasti i kompaktni sloj najvećim su dijelom odgovorni za stvaranje fibroznog skeleta koji daje čvrstoću amniju. Ispod stromalnog dijela nalazi se spužvasti dio koji je građen od proteoglikana, glikoproteina i kolagena tipa III. Retikularni sloj je građen od fibrilarnog kolagena te je veza između spužvastog sloja i korija. Korij je sastavljen od epitelnih stanica. Vezu između korija i amnija čini i izvanstanični matriks u kojem se nalaze mezenhimalne stromalne stanice. One imaju sposobnost razgradnje kolagena te omogućavaju komunikaciju između korija i amnija (5,115).

Plodovi ovoji omogućavaju mehaničku i imunološku zaštitu te čine zapreku uzlaznom putu bakterija. Ova uloga osnažena je proizvodnjom različitih citokina tijekom trudnoće i porođaja. Slabljenje imunološke i/ili mehaničke uloge plodovih ovoja stvara povoljno okruženje za ulazak mikroorganizama u plodovu šupljinu, aktivaciju upalnog odgovora domaćina i stvaranje proupalnih citokina koji dovode do razgradnje kolagena u izvanstaničnom matriksu i PPPPO (5). Oni, osim u razgradnji plodovih ovoja, sudjeluju u nizu procesa koji su povezani mehanizmom poroda kao što su sazrijevanje cerviksa putem poticanja sinteze dušikovog oksida, prostaglandina i matriksmetaloproteinaza (20). Slično se vidi i kod prijevremenog odljuštenja posteljice s pojačanim stvaranjem trombina (116). Poremećena funkcija plodovih ovoja jasnije je izražena u PPPPO nego u spontanim prijevremenim porodima (5). Postoji i niz sličnosti, ali i razlika između PPPPO i spontanog prijevremenog poroda. Tako je aktivnost MMP/TIMP u PPPPO pojačana, dok je duljina telomeraza u spontanom prijevremenom porodu veća. S druge strane imaju najvjerojatnije sličnu etiologiju i povezanost kolonizacije plodne vode i cervikovaginalne tekućine mikoplazmom (5). Razgradnja izvanstaničnog matriksa bogatog kolagenom koji

povezuje amnij i korij  jedan je od najvažnijih događaja koji dovodi do PPPPO. Ovaj proces, uz proupalne citokine, posredovan je s nekoliko različitih MMP koje razgrađuju pojedini kolagen. Aktivnost MMP u plodovim ovojima precizno je regulirana transkripcijom, translacijom te post-translacijskim modifikacijama MMP i njihovih endogenih inhibitora tkivno specifičnih MMP (eng. *Tissue specific inhibitors of metalloproteinases*-TIMP). Čini se da je ravnoteža u aktivnosti MMP i TIMP u plodovim ovojima neophodna za očuvanje njihova integriteta. Iako znanstvenih potvrda još nema, jasno je da proteaze, koje nastaju kao posljedica infekcije i/ili upale, mogu aktivirati endogeni MMP u plodovim ovojima, dovodeći do razgradnje kolagena i slabljenja membrana (20,62,114).

Brojni su činitelji rizika za PPPPO osim unutarmaternične infekcije. Poznato je nekoliko procesa koji mogu biti okidač zajedničkog puta u mehanizmu prijevremenog poroda. Patološki procesi uključeni u aktivaciju zajedničkog puta, u sindromu prijevremenog poroda, su unutarmaternična i/ili sistemska infekcija, prekomjerno rastezanje  maternice, ishemija uterusa i posteljice te decidualno krvarenje, neprimjerena reakcija majčinog imunološkog sustava na alograft, uzroci povezani s alergijom, insuficijencija materničnog vrata kao i endokrini poremećaji (7).

Unutarmaternična infekcija povezana je sa značajnim nakupljanjem upalnih stanica u plodovim ovojima kao i proizvodnjom proupalnih citokina. Ti citokini imaju utjecaj na niz procesa povezanih s porodom pa tako i prijevremenim prsnućem plodovih ovoja (6,7,117).

Ipak još nije jasno je li bakterijska infekcija uzrok ili posljedica PPPPO. Nekoliko je činjenica koje su poznate o povezanosti PPPPO i unutarmaternične infekcije. One se odnose na prisutnost različitih mikroorganizama u plodovoj vodi, stvaranje toksina koji se povezuju s PPPPO, kao i njihovoj koncentraciji koja je neophodna za nastanak ove komplikacije (5). Danas znamo da u plodovoj vodi moraju biti specifični mikroorganizmi koji stvaraju određene toksine da bi nastupio PPPPO. To znači da nije svaki mikroorganizam u stanju stvoriti toksine koji se povezuju s PPPPO. Za prsnuće plodnih ovoja u *in vitro* uvjetima neophodna je i određena koncentracija bakterijskih toksina u plodovoj vodi (118–120). PPPPO se viđa i u trudnica sa SIAI u kojih su dokazani mikroorganizmi za koje nije utvrđeno da imaju sposobnost stvaranja spojeva koji mogu dovesti do razgradnje plodovih ovoja (118,120).

Najveći broj bakterijskih enzima nema sposobnost razgradnje izvanstaničnog matriksa. U niza trudnica koje su imale uspješnu antibiotsku terapiju radi periodontalne bolesti i bakterijske vaginoze također se pojavljuje PPPPO. Postoje izvješća da se PPPPO može javiti i u slučajevima sterilne upale u plodovim ovojima (stanje u kojem postoje pokazatelji upalne reakcije, a bez dokazanih mikroorganizama, bilo molekularnim istraživanjem, bilo metodama kultiviranja) (5,62,77).

PPPPO je krajnji događaj koji ishodište može imati u čitavom nizu različitih procesa. Osim već prije spomenute infekcije spolnog sustava majke, navode se način života (pušenje cigareta, korištenje opijata, spolni odnosi tijekom trudnoće), različiti poremećaji u trudnoći ili pak čimbenici okoliša (77).

Jedan od patofizioloških činitelja PPPPO koji se zanemaruje je i oksidativni stres i stvaranje slobodnih radikala kisika (eng. *Reactive oxygen species*-ROS). U urednim trudnoćama postoji ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala kisika i antioksidansa. U nekim trudnoćama u kojima postoji intrinzična mikrovaskularna bolest (poremećaj placentacije) ili manjak antioksidansa dolazi do neravnoteže između ROS i zaštitnih čimbenika. Slično je i u onih žena u kojih postoje prije poznati rizici za PPPPO, kao što je pušenje cigareta. U tih trudnica dolazi do pojačanog stvaranja superoksid aniona, vodikova peroksida, hidroksil iona te dušikova oksida koji mogu oštetiti izvanstanični matriks bogat kolagenom. Kolagen je bjelančevina koja je jako podložna djelovanju slobodnih radikala kisika. Superoksid anion u *in vitro* uvjetima potiče razgradnju kolagena u 4-hidroksiprolin (121). Slično je i s kolagenolitičkim enzimima koji se stvaraju tijekom sindroma intraamnijske infekcije. Oni su podložni djelovanju slobodnih radikala kisika (121). Superoksid dismutaze i glutation, prekursor N-acetilcisteina, poznati su antioksidansi koji smanjuju aktivnost MMP9 (122). Lappas i suradnici dokazali su inhibiciju MMP9 i drugih proupalnih medijatora korištenjem antioksidansa NAC 51 koji inhibira NF-kB aktiviran put i posljedično fosfolipidni metabolizam, oslobađanje proupalnih citokina i aktivnost proteaza u plodovim ovojima ljudskih trudnoća (123). Sve navedeno pokazuje da je oksidativni stres, uz upalu, jedan od glavnih fenomena povezanih uz PPPPO. Oba stanja (upala i oksidativni stres) javljaju se kao reakcija na neki okidač koji u konačnici dovodi do prijevremenog prsnuća plodovih ovoja (5). Istraživanja u bolesnica s rakom dojke pokazala su da unutarstanično nakupljanje ROS-a pojačava aktivnost MMP9, a smanjuje količinu mRNA za RECK (109,124). Sličnih istraživanja o povezanosti ROS i RECK proteina u plodovim ovojima nema. Međutim postoji istraživanje o povezanosti ROS i IL-6 u različitim tumorskim tkivima (31).

Poznata je veza između duljine telomera i oksidativnog stresa (2–4). Telomere su strukture smještene na vrhovima kromosoma, a njihova duljina postupno se smanjuje tijekom vremena zbog diobe i starenja stanica. Stoga se mogu smatrati pokazateljem biološke dobi. Telomere se skraćuju kao posljedica oksidativnog stresa (2–4). Glavna gvanin ponavljajuća sekvenca (TTAGGG) u telomerama osjetljiva je na oštećenje prouzročeno oksidativnim stresom. Istraživanja su pokazala da je u trudnica s PPPPO, u usporedbi s onima sa spontanim prijevremenim porodom, duljina telomera u plodovim ovojima bila kraća. To bi navodilo na zaključak da su one bile izložene većem oksidativnom stresu i bržem starenju. Zanimljivo je da

značajne razlike u duljini telomera u plodovim ovojima između PPPPO i terminskog poroda nema, što bi značilo da je u oba slučaja skraćenje telomera posljedica oksidativnog stresa. Moglo bi se zaključiti da je starenje plodovih ovoja fiziološki proces koji je u slučaju PPPPO ubrzan kao odgovor na oksidativni stres koji potiče čimbenike rizi ka za PPPPO (2,5). Sterilna upala (eng. *Sterile senescence associated secretory phenotype*-SASP) značajka je starenja stanice i povezana je s prisutnošću različitih upalnih biomarkera i enzima koji imaju sposobnost razgradnje izvanstaničnog matriksa. Dokazano je u laboratorijskim uvjetima da ROS mogu izazvati promjene u plodovim ovojima, identične onima koje se vide kod starenja i SASP (6,97). Markeri SASP u laboratorijskim uvjetima mogu izazvati uterotoničku aktivnost.

Znano je da u plodovim ovojima postoje i mikrofrakture koje su najvjerojatnije mjesta gdje se tkivo remodelira. U plodovim ovojima nakon PPPO-a pronađeno je povećanje u broju i morfometriji ovih mikrofraktura. One mogu djelovati kao kanali kroz koje može istjecati plodova voda, ali mogu služiti i kao put za ulaz mikroorganizama te upalnih stanica (5).

Ova je studija pokazala da u plodovim ovojima kasnih nedonošenih trudnoća postoji imunohistokemijska izražajnost RECK proteina. U skupini s histološki dokazanim korioamnionitisom i PPPPO izražajnost RECK proteina bila je smanjena u odnosu na skupinu s kasnim spontanim prijevremenim porođajem. RECK protein mogao bi biti jedan od markera prijevremenog poroda, no za to bi bilo potrebno provesti opsežnija istraživanja na većem broju uzoraka kao i vjerojatno drugom metodom (PCR ili neka druga).

Mišljenja smo da bi u budućnosti bilo korisno istražiti ulogu RECK proteina i ROS u mehanizmu početka prijevremenog poroda jer bi, po dosadašnjim saznanjima o RECKu i ROSu, njihovo međudjelovanje moglo biti međusobno poništavajuće. Ako bi hipoteza bila potvrđena, otvarale bi se možda neke nove farmakološke mogućnosti sprečavanja prijevremenog poroda.

Također bi se u pogledu uloge IL-6, ako bi ideja o trans i klasičnom putu signalizacije IL-6 bila potvrđena, otvorile nove mogućnosti za prevenciju, sprečavanje i liječenje kasnog prijevremenog poroda. Istraživanja u budućnosti bi se, osim na ovu skupinu prijevremenih poroda, trebala koncentrirati i na ekstremnu, tešku i umjerenu nedonošenost s obzirom na poznate epidemiološke podatke o njihovoj povezanosti s perinatalnim mortalitetom i morbiditetom. Iako u ukupnom broju oni čine manji dio prijevremenih poroda, njihov sveukupni značaj za kasniji razvoj djece je veći.

# 6. ZAKLJUČCI

1. U plodovim ovojima kasnih nedonošenih trudnoća postoji imunohistokemijska izražajnost RECK proteina i IL-6.
2. U skupini trudnica s histološki dokazanim korioamnionitisom i prijevremenim prsnućem plodnih ovoja imunohistokemijska izražajnost RECK proteina smanjena je u odnosu na skupinu s kasnim spontanim prijevremenim porodom bez znakova histološkog korioamnionitisa.
3. U skupini trudnica s histološki dokazanim korioamnionitisom i prijevremenim prsnućem plodnih ovoja nema razlike u imunohistokemijskoj izražajnosti IL-6 u odnosu na skupinu s kasnim spontanim prijevremenim porodom bez znakova histološkog korioamnionitisa.
4. U skupini trudnica s kasnim spontanim prijevremenim porodom i histološki dokazanim korioamnionitisom, imunohistokemijska izražajnost RECK proteina smanjena je u odnosu na skupinu s kasnim spontanim prijevremenim porodom bez histoloških znakova korioamnionitisa.
5. U skupini trudnica s kasnim spontanim prijevremenim porodom i histološki dokazanim korioamnionitisom nema razlike u imunohistokemijskoj izražajnosti IL-6 u odnosu na skupinu s kasnim spontanim prijevremenim porodom bez histoloških znakova korioamnionitisa.
6. U skupini trudnica s histološki dokazanim korioamnionitisom i prijevremenim prsnućem plodnih ovoja nema razlike u imunohistokemijskoj izražajnosti RECK proteina u odnosu na skupinu s kasnim spontanim prijevremenim porodom uz znakove histološkog korioamnionitisa.
7. U skupini trudnica s histološki dokazanim korioamnionitisom i prijevremenim prsnućem plodnih ovoja nema razlike u imunohistokemijskoj izražajnosti IL-6 u odnosu na skupinu s kasnim spontanim prijevremenim porodom uz znakove histološkog korioamnionitisa.

# 7. SAŽETAK

Cilj istraživanja je ispitati postoji li povezanost imunohistokemijske ekspresije interleukina 6 i prisutnosti RECK proteina u plodovim ovojima trudnica koje su rodile u gestacijskoj dobi 34 - $36^{+6/7}$ te su imale histološke značajke korioamnionitisa i PPPPO i skupine onih koje su imale spontani prijevremeni porod u istoj gestacijskoj dobi bez znakova korioamnionitisa.

Materijali i metode: U istraživanje je uključeno 60 trudnica koje su rodile u gestacijskoj dobi 34 - $36^{+6/7}$ trudnoće. Trudnice su grupirane u dvije skupine po 30 ispitanica. Prvu su činile one u kojoj je histološki dokazan korioamnionitis te koje su imale PPPPO. Drugu skupinu su činile one koje su imale spontani prijevremeni porod u istoj gestacijskoj dobi bez znakova korioamnionitisa. Plodovi ovoji izuzimani su nakon poroda te je na njima, nakon obrade i pripreme, rađena imunohistokemijska ekspresija RECK proteina te IL-6. Imunohistokemijska izražajnost RECK i IL-6 je kategorizirana kao stupanj obojenosti citoplazme i to: 0 - nema obojanosti - ne detektira se; 1 - slaba obojanost; 2 - jaka obojanost.

Rezultati: Nije nađena statistički značajna razlika u smislu životne dobi rodilja, trajanja trudnoće, pariteta i indeksa tjelesne mase između rodilja iz istraživanih skupina.

U skupini trudnica koje su rodile u gestacijskoj dobi 34 - $36^{+6/7}$ tjedana, te su imale histološke značajke korioamnionitisa uz PPPPO pronašli smo statistički značajno slabiju imunohistokemijsku izražajnost RECK proteina u odnosu na one koje su imale spontani prijevremeni porođaj ($\chi^2$=4,29, p=0,04) bez znakova korioamnionitisa. U obje istraživane skupine imunohistokemijska izražajnost IL-6 je bila jaka, ali nije bilo statistički značajne razlike (Fischer egzaktni test=0,61; p>0,05).

Zaključak: U kasnim nedonošenim trudnoćama histološki dokazani korioamnonitis povezan s PPPPO ima utjecaja na smanjenu imunohistokemijsku izražajnost RECK proteina u plodovim ovojima, ali nema utjecaja na ekspresiju IL-6.

## 8. SUMMARY

Objective of this research is to find out is there an association between immunohistochemical expression of Interleukin 6 and presence of RECK protein in fetal membranes of women who had late preterm delivery at 34-$36^{+6/7}$ weeks and had histological features of chorioamnionitis and PPROM and a group of women who had spontaneous premature birth at the same gestational age without histological features of chorioamnionitis.

Materials and methods: There have been 60 women who gave birth at gestational age of 34-$36^{+6/7}$. They were divided into two groups (30 pregnant women in each group). In the first group there were women with histological features of chorioamnionitis who also had PPROM. In the second group were women who had spontaneous preterm delivery at the same gestational age without histological features of chorioamnionitis.

Fetal membranes had been collected after delivery and after that immunohistochemistry was preformed using monoclonal antibodies against RECK protein and IL-6. The intensity of anti RECK and IL-6 cytoplasmic staining of placental membranes was categorized as: 0 - undetectable; 1 - weak; 2 – strong; according to the protocol of Scheller et al. (104). SPSS version 17.0 was used for statistical analysis.

Results: No statistically significant difference has been found in the terms of the age of pregnant women, duration of pregnancy, parity and body mass index between two research groups.

In the group of pregnant women who gave birth at gestational age of 34-36 and who had histological characteristics of chorioamnionitis and PPROM we found statistically significant weaker immunohistochemical expressiveness of RECK protein in comparison to those who gave spontaneous premature birth ($\chi^2$=4,29, p=0,04). In both research groups immunohistochemical expressiveness of IL-6 was very strong, but with no statistically significant difference (Fischer exact test= 0.61; p>0,05).

Conclusion: In fetal membranes of women who had late preterm delivery histologically proven chorioamnionitis has impact on immunohistological expresiveness of RECK protein, but has no impact on the expression of IL-6.

LITERATURA


1. Gabbe, Jauniaux. Gabbe's Obstetrics: Normal and Problem Pregnancies - 8th Edition [Internet]. [cited 2021 Feb 21]. Dostupno s: https://www.elsevier.com/books/obstetrics-normal-and-problem-pregnancies/landon/978-0-323-60870-1

2. Shammas MA. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2011;14(1):28–34.

3. Ko E, Seo H-W, Jung G. Telomere length and reactive oxygen species levels are positively associated with a high risk of mortality and recurrence in hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2018;67(4):1378–91.

4. Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC. The telomere hypothesis of cellular aging. Exp Gerontol. 1992;27(4):375–82.

5. Menon R, Richardson LS. Preterm prelabor rupture of the membranes: A disease of the fetal membranes. Semin Perinatol. 2017;41(7):409–19.

6. Behnia F, Taylor BD, Woodson M, Kacerovsky M, Hawkins H, Fortunato SJ, et al. Chorioamniotic membrane senescence: a signal for parturition? Am J Obstet Gynecol. 2015;213(3):359.1-16.

7. Kim CJ, Romero R, Chaemsaithong P, Chaiyasit N, Yoon BH, Kim YM. Acute Chorioamnionitis and Funisitis: Definition, Pathologic Features, and Clinical Significance. Am J Obstet Gynecol. 2015;213(4 0):29–52.

8. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Collagenolytic enzymes (gelatinases) and their inhibitors in human amniochorionic membrane. Am J Obstet Gynecol. 1997;177(4):731–41.

9. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. Science. 2014;345(6198):760–5.

10. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. Annu Rev Biochem. 2009;78:929–58.

11. Laronha H, Caldeira J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. Cells [Internet]. 2020 Apr 26 [cited 2021 Jun 8];9(5). Dostupno s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7290392/

12. Strauss, JF. Extracellular Matrix Dynamics and Fetal Membrane Rupture. Reprod Sci. 2013;20(2):140–53.

13. de Souza RR. Aging of myocardial collagen. Biogerontology. 2002;3(6):325–35.

14. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. FASEB J. 1991;5(13):2814–23.

15. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res. 2006;69(3):562–73.

16. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. Prog Mol Biol Transl Sci. 2017;147:1–73.

17. Liu J, Khalil RA. Matrix Metalloproteinase Inhibitors as Investigational and Therapeutic Tools in Unrestrained Tissue Remodeling and Pathological Disorders. Prog Mol Biol Transl Sci. 2017;148:355–420.

18. Rangasamy L, Geronimo BD, Ortín I, Coderch C, Zapico JM, Ramos A, et al. Molecular Imaging Probes Based on Matrix Metalloproteinase Inhibitors (MMPIs). Molecules. 2019;24(16).

19. Mannello F, Medda V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. Prog Histochem Cytochem. 2012;47(1):27–58.

20. Athayde N, Edwin SS, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, et al. A role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes. Am J Obstet Gynecol. 1998;179(5):1248–53.

21. Fortunato SJ, Menon R. Distinct molecular events suggest different pathways for preterm labor and premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol. 2001;184(7):1399–405;1405-06.

22. Welm B, Mott J, Werb Z. Developmental biology: vasculogenesis is a wreck without RECK. Curr Biol. 2002;12(6):209-11.

23. Alexius-Lindgren M, Andersson E, Lindstedt I, Engström W. The RECK gene and biological malignancy--its significance in angiogenesis and inhibition of matrix metalloproteinases. Anticancer Res. 2014;34(8):3867–73.

24. Noda M, Oh J, Takahashi R, Kondo S, Kitayama H, Takahashi C. RECK: A novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. Cancer Metastasis Rev. 2003;22(2):167–75.

25. Masui T, Doi R, Koshiba T, Fujimoto K, Tsuji S, Nakajima S, et al. RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. Clin Cancer Res. 2003;9(5):1779–84.

26. Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. Cell. 2001;107(6):789–800.

27. Miki T, Shamma A, Kitajima S, Takegami Y, Noda M, Nakashima Y, et al. The ß1-integrin-dependent function of RECK in physiologic and tumor angiogenesis. Mol Cancer Res. 2010;8(5):665–76.

28. Chandana EPS, Maeda Y, Ueda A, Kiyonari H, Oshima N, Yamamoto M, et al. Involvement of the Reck tumor suppressor protein in maternal and embryonic vascular remodeling in mice. BMC Dev Biol. 2010;10:84.

29. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;6(10):016295.

30. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. Biochem J. 1990;265(3):621–36.

31. Mitazaki S, Hashimoto M, Matsuhashi Y, Honma S, Suto M, Kato N, et al. Interleukin-6 modulates oxidative stress produced during the development of cisplatin nephrotoxicity. Life Sci. 2013;92(12):694–700.

32. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. Nat Immunol. 2015;16(5):448–57.

33. Rose-John S. Interleukin-6 signalling in health and disease. F1000Res [Internet]. 2020 Aug 20 [cited 2021 Mar 20];9. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7443778/

34. Lee SY, Buhimschi IA, Dulay AT, Ali UA, Zhao G, Abdel-Razeq SS, et al. IL-6 trans-signaling system in intra-amniotic inflammation, preterm birth, and preterm premature rupture of the membranes. J Immunol. 2011;186(5):3226–36.

35. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. Annu Rev Immunol. 2005;23:1–21.

36. Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJA, Sato TA, Marvin KW, Mitchell MD. Cytokines, prostaglandins and parturition--a review. Placenta. 2003;24(Suppl A):33-46.

37. Schett G. Physiological effects of modulating the interleukin-6 axis. Rheumatology. 2018;57(suppl2):43–50.

38. Delnord M, Blondel B, Zeitlin J. What contributes to disparities in the preterm birth rate in European countries? Curr Opin Obstet Gynecol. 2015;27(2):133–42.

39. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. Lancet. 2008;371(9606):75–84.

40. Ananth CV, Vintzileos AM. Epidemiology of preterm birth and its clinical subtypes. J Matern Fetal Neonatal Med. 2006;19(12):773–82.

41. Bettegowda VR, Dias T, Davidoff MJ, Damus K, Callaghan WM, Petrini JR. The relationship between cesarean delivery and gestational age among US singleton births. Clin Perinatol. 2008;35(2):309–23.

42. Muglia LJ, Katz M. The enigma of spontaneous preterm birth. N Engl J Med. 2010;362(6):529–35.

43. Russell RB, Petrini JR, Damus K, Mattison DR, Schwarz RH. The changing epidemiology of multiple births in the United States. Obstet Gynecol. 2003;101(1):129–35.

44. Raju TNK. Epidemiology of late preterm (near-term) births. Clin Perinatol. 2006;33(4):751–63.

45. Damus K. Prevention of preterm birth: a renewed national priority. Curr Opin Obstet Gynecol. 2008;20(6):590–6.

46. Menon R, Peltier MR, Eckardt J, Fortunato SJ. Diversity in cytokine response to bacteria associated with preterm birth by fetal membranes. Am J Obstet Gynecol. 2009;201(3):306.1-6.

47. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. Science. 2014;345(6198):760–5.

48. Smith R. Parturition. N Engl J Med. 2007;356(3):271–83.

49. McLean M, Bisits A, Davies J, Woods R, Lowry P, Smith R. A placental clock controlling the length of human pregnancy. Nat Med. 1995;1(5):460–3.

50. Torricelli M, Ignacchiti E, Giovannelli A, Merola A, Scarpetti E, Calonaci G, et al. Maternal plasma corticotrophin-releasing factor and urocortin levels in post-term pregnancies. Eur J Endocrinol. 2006;154(2):281–5.

51. Grammatopoulos DK, Hillhouse EW. Activation of protein kinase C by oxytocin inhibits the biological activity of the human myometrial corticotropin-releasing hormone receptor at term. Endocrinology. 1999;140(2):585–94.

52. Challis JRG null, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. Endocr Rev. 2000;21(5):514–50.

53. Mendelson CR. Minireview: fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. Mol Endocrinol. 2009;23(7):947–54.

54. Diaz-Cueto L, Dominguez-Lopez P, Cantillo-Cabarcas J, Perez-Figueroa G, Arechavaleta-Velasco M, Arechavaleta-Velasco F. Progesterone receptor gene polymorphisms are not associated with preterm birth in a Hispanic population. International Journal of Gynecology & Obstetrics. 2008;103(2):153–7.

55. Chen C, Opazo JC, Erez O, Uddin M, Santolaya-Forgas J, Goodman M, et al. The human progesterone receptor shows evidence of adaptive evolution associated with its ability to act as a transcription factor. Mol Phylogenet Evol. 2008;47(2):637–49.

56. Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. Am J Obstet Gynecol. 1998;179(1):194–202.

57. Onderdonk AB, Hecht JL, McElrath TF, Delaney ML, Allred EN, Leviton A, et al. Colonization of second-trimester placenta parenchyma. Am J Obstet Gynecol. 2008;199(1):52.1-52.10.

58. Nygren P, Fu R, Freeman M, Bougatsos C, Klebanoff M, Guise J-M, et al. Evidence on the benefits and harms of screening and treating pregnant women who are asymptomatic for bacterial vaginosis: an update review for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern Med. 2008;148(3):220–33.

59. Wilson L, Parsons MT, Flouret G. Inhibition of spontaneous uterine contractions during the last trimester in pregnant baboons by an oxytocin antagonist. Am J Obstet Gynecol. 1990;163(6):1875–82.

60. Ou CW, Orsino A, Lye SJ. Expression of connexin-43 and connexin-26 in the rat myometrium during pregnancy and labor is differentially regulated by mechanical and hormonal signals. Endocrinology. 1997;138(12):5398–407.

61. Shynlova OP, Oldenhof AD, Liu M, Langille L, Lye SJ. Regulation of c-fos expression by static stretch in rat myometrial smooth muscle cells. Am J Obstet Gynecol. 2002;186(6):1358–65.

62. Menon R, Fortunato SJ. Infection and the role of inflammation in preterm premature rupture of the membranes. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2007;21(3):467–78.

63. Lalanne C, Mironneau C, Mironneau J, Savineau JP. Contractions of rat uterine smooth muscle induced by acetylcholine and angiotensin II in Ca2+-free medium. Br J Pharmacol. 1984;81(2):317–26.

64. Campos GA, Guerra FA, Israel EJ. Angiotensin II induced release of prostaglandins from rat uterus. Arch Biol Med Exp. 1983;16(1):43–9.

65. Rosen T, Schatz F, Kuczynski E, Lam H, Koo AB, Lockwood CJ. Thrombin-enhanced matrix metalloproteinase-1 expression: a mechanism linking placental abruption with premature rupture of the membranes. J Matern Fetal Neonatal Med. 2002;11(1):11–7.

66. Elovitz MA, Saunders T, Ascher-Landsberg J, Phillippe M. Effects of thrombin on myometrial contractions in vitro and in vivo. Am J Obstet Gynecol. 2000;183(4):799–804.

67. Elovitz MA, Baron J, Phillippe M. The role of thrombin in preterm parturition. Am J Obstet Gynecol. 2001;185(5):1059–63.

68. Gomez-Lopez N, StLouis D, Lehr MA, Sanchez-Rodriguez EN, Arenas-Hernandez M. Immune cells in term and preterm labor. Cell Mol Immunol. 2014;11(6):571–81.

69. Bytautiene E, Romero R, Vedernikov YP, El-Zeky F, Saade GR, Garfield RE. Induction of premature labor and delivery by allergic reaction and prevention by histamine H1 receptor antagonist. Am J Obstet Gynecol. 2004;191(4):1356–61.

70. Giangrande PH, Kimbrel EA, Edwards DP, McDonnell DP. The Opposing Transcriptional Activities of the Two Isoforms of the Human Progesterone Receptor Are Due to Differential Cofactor Binding. Molecular and Cellular Biology. 2000;20(9):3102–15.

71. Condon JC, Jeyasuria P, Faust JM, Wilson JW, Mendelson CR. A decline in the levels of progesterone receptor coactivators in the pregnant uterus at term may antagonize progesterone receptor function and contribute to the initiation of parturition. PNAS. 2003;100(16):9518–23.

72. Manuck TA, Major HD, Varner MW, Chettier R, Nelson L, Esplin MS. Progesterone receptor genotype, family history, and spontaneous preterm birth. Obstet Gynecol. 2010;115(4):765–70.

73. Zachariades E, Mparmpakas D, Pang Y, Rand-Weaver M, Thomas P, Karteris E. Changes in placental progesterone receptors in term and preterm labour. Placenta. 2012;33(5):367–72.

74. Ziyan J, Huaibin R, Xiaotian M, Guangtong S, Xiaoqing C, Zijiang D, et al. Regulation of progesterone receptor A and B expression in human preterm, term, and postterm placental villi. Acta Obstet Gynecol Scand. 2010;89(5):705–11.

75. Vora S, Abbas A, Kim CJ, Summerfield TLS, Kusanovic JP, Iams JD, et al. Nuclear factor-kappa B localization and function within intrauterine tissues from term and preterm labor and cultured fetal membranes. Reprod Biol Endocrinol. 2010;8:8.

76. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. Semin Reprod Med. 2007;25(1):21–39.

77. Romero R, Miranda J, Chaemsaithong P, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Dong Z, et al. Sterile and Microbial-associated Intra-amniotic Inflammation in Preterm Prelabor Rupture of Membranes. J Matern Fetal Neonatal Med. 2015;28(12):1394–409.

78. Beta J, Lesmes C, Bedetti C, Akolekar R. Risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: A systematic review of the literature. Minerva ginecologica. 2017;70(2):215-19.

79. Niederstrasser SL, Hammer K, Möllers M, Falkenberg MK, Schmidt R, Steinhard J, et al. Fetal loss following invasive prenatal testing: a comparison of transabdominal chorionic villus sampling, transcervical chorionic villus sampling and amniocentesis. J Perinat Med. 2017;45(2):193–8.

80. DiGiulio DB, Romero R, Kusanovic JP, Gómez R, Kim CJ, Seok KS, et al. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. Am J Reprod Immunol. 2010;64(1):38–57.

81. Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, Kim GJ, Kim MR, Kuivaniemi H, et al. Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. Am J Obstet Gynecol. 2004;191(4):1346–55.

82. Sorokin Y, Romero R, Mele L, Wapner RJ, Iams JD, Dudley DJ, et al. Maternal serum interleukin-6, C-reactive protein, and matrix metalloproteinase-9 concentrations as risk factors for preterm birth <32 weeks and adverse neonatal outcomes. Am J Perinatol. 2010;27(8):631–40.

83. Redline RW. Inflammatory response in acute chorioamnionitis. Semin Fetal Neonatal Med. 2012;17(1):20–5.

84. Kumar D, Fung W, Moore RM, Pandey V, Fox J, Stetzer B, et al. Proinflammatory cytokines found in amniotic fluid induce collagen remodeling, apoptosis, and biophysical weakening of cultured human fetal membranes. Biol Reprod. 2006;74(1):29–34.

85. Haddad R, Tromp G, Kuivaniemi H, Chaiworapongsa T, Kim YM, Mazor M, et al. Human spontaneous labor without histologic chorioamnionitis is characterized by an acute inflammation gene expression signature. Am J Obstet Gynecol. 2006;195(2):394.1-24.

86. Van der Ham D, Teeffelen A, Mol BW. Prelabour rupture of membranes: Overview of diagnostic methods. Current opinion in obstetrics & gynecology. 2012;24:408–12.

87. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Role of tumor necrosis factor-alpha in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. Am J Obstet Gynecol. 2002;187(5):1159–62.

88. Kenyon SL, Taylor DJ, Tarnow-Mordi W, ORACLE Collaborative Group. Broad-spectrum antibiotics for preterm, prelabour rupture of fetal membranes: the ORACLE I randomised trial. ORACLE Collaborative Group. Lancet. 2001;357(9261):979–88.

89. Garite TJ, Freeman RK. Chorioamnionitis in the preterm gestation. Obstet Gynecol. 1982;59(5):539–45.

90. Beydoun SN, Yasin SY. Premature rupture of the membranes before 28 weeks: conservative management. Am J Obstet Gynecol. 1986;155(3):471–9.

91. Major CA, de Veciana M, Lewis DF, Morgan MA. Preterm premature rupture of membranes and abruptio placentae: Is there an association between these pregnancy complications? American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1995;172(2):672–6.

92. Ananth CV, Oyelese Y, Srinivas N, Yeo L, Vintzileos AM. Preterm premature rupture of membranes, intrauterine infection, and oligohydramnios: risk factors for placental abruption. Obstet Gynecol. 2004;104(1):71–7.

93. Committee on Practice Bulletins-Obstetrics. ACOG Practice Bulletin No. 188: Prelabor Rupture of Membranes. Obstet Gynecol. 2018;131(1):1–14.

94. Prelabor Rupture of Membranes | ACOG [Internet]. [cited 2021 Feb 21]. Dostupno s: https://www.acog.org/clinical/clinical-guidance/practice-bulletin/articles/2020/03/prelabor-rupture-of-membranes

95. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. Obstet Gynecol. 2003;101(1):178–93.

96. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Amniochorion gelatinase-gelatinase inhibitor imbalance in vitro: a possible infectious pathway to rupture. Obstet Gynecol. 2000;95(2):240–4.

97. Coppé J-P, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. PLoS Biol. 2008;6(12):2853–68.

98. Eriksen NL, Parisi VM, Daoust S, Flamm B, Garite TJ, Cox SM. Fetal fibronectin: a method for detecting the presence of amniotic fluid. Obstet Gynecol. 1992;80(3):451–4.

99. Lee SM, Lee J, Seong HS, Lee SE, Park JS, Romero R, et al. The clinical significance of a positive Amnisure test in women with term labor with intact membranes. J Matern Fetal Neonatal Med. 2009;22(4):305–10.

100. Kim SY, Kwon HS, Lee J, Sul AR, Ko HS, Yang JI. Questionnaire survey on the management of pregnant women with preterm premature rupture of membranes. Obstetrics & Gynecology Science. 2020;63(3):286–92.

101. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth - Roberts, D - 2017 | Cochrane Library [Internet]. [cited 2021 Feb 21]. Dostupno s: https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD004454.pub3/full

102. Kenyon S, Boulvain M, Neilson JP. Antibiotics for preterm rupture of membranes. Cochrane Database Syst Rev. 2010;(8):CD001058.

103. Garite TJ, Keegan KA, Freeman RK, Nageotte MP. A randomized trial of ritodrine tocolysis versus expectant management in patients with premature rupture of membranes at 25 to 30 weeks of gestation. Am J Obstet Gynecol. 1987;157(2):388–93.

104. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2011;1813(5):878–88.

105. Benzon Z, Benzon S, Tomaš SZ, Prusac IK, Vulić L, Vulić M, et al. Immunohistochemical demonstration of RECK protein and interleukin-6 in fetal membranes from singleton pregnancies with late preterm delivery, intact membranes and histological chorioamnionitis. Biotech Histochem. 2018;93(8):575–80.

106. Benzon Z, Kuzmić Prusac I, Zekić Tomas S, Vulić M. Immunohistochemical expression of RECK protein in placental membranes of the preterm delivery with and without chorioamnionitis. Histology and histopathology. 2014;29(5):629–33.

107. Guo J, Zou L. Correlation of RECK with matrix metalloproteinase-2 in regulation of trophoblast invasion of early pregnancy. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2006;26(6):738–40.

108. De Paiva CS, Corrales RM, Villarreal AL, Farley WJ, Li D-Q, Stern ME, et al. Corticosteroid and doxycycline suppress MMP-9 and inflammatory cytokine expression, MAPK activation in the corneal epithelium in experimental dry eye. Exp Eye Res. 2006;83(3):526–35.

109. Xiao JP, Yin YX, Gao YF, Lau S, Shen F, Zhao M, et al. The increased maternal serum levels of IL-6 are associated with the severity and onset of preeclampsia. Cytokine. 2012;60(3):856–60.

110. Arechavaleta-Velasco F, Ogando D, Parry S, Vadillo-Ortega F. Production of matrix metalloproteinase-9 in lipopolysaccharide-stimulated human amnion occurs through an autocrine and paracrine proinflammatory cytokine-dependent system. Biol Reprod. 2002;67(6):1952–8.

111. Zhang B, Zhang J, Xu Z-Y, Xie H-L. Expression of RECK and matrix metalloproteinase-2 in ameloblastoma. BMC Cancer. 2009;9(1):427.

112. Gulati S, Bhatnagar S, Raghunandan C, Bhattacharjee J. Interleukin-6 as a Predictor of Subclinical Chorioamnionitis in Preterm Premature Rupture of Membranes. American Journal of Reproductive Immunology. 2012;67(3):235–40.

113. Matthews V, Schuster B, Schütze S, Bussmeyer I, Ludwig A, Hundhausen C, et al. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). J Biol Chem. 2003;278(40):38829–39.

114. Menon R, Taylor RN, Fortunato SJ. Chorioamnionitis--a complex pathophysiologic syndrome. Placenta. 2010;31(2):113–20.

115. Hay ED. Extracellular matrix. Journal of Cell Biology. 1981;91(3):205–23.

116. Puthiyachirakkal M, Lemerand K, Kumar D, Moore R, Philipson E, Mercer BM, et al. Thrombin weakens the amnion extracellular matrix (ECM) directly rather than through protease activated receptors. Placenta. 2013;34(10):924–31.

117. Cervigni M, Natale F. The use of synthetics in the treatment of pelvic organ prolapse. Curr Opin Urol. 2001;11(4):429–35.

118. McGregor JA, Lawellin D, Franco-Buff A, Todd JK, Makowski EL. Protease production by microorganisms associated with reproductive tract infection. Am J Obstet Gynecol. 1986;154(1):109–14.

119. McGregor JA, French JI, Lawellin D, Franco-Buff A, Smith C, Todd JK. Bacterial protease-induced reduction of chorioamniotic membrane strength and elasticity. Obstet Gynecol. 1987;69(2):167–74.

120. French JI, McGregor JA. The pathobiology of premature rupture of membranes. Semin Perinatol. 1996;20(5):344–68.

121. Monboisse JC, Braquet P, Randoux A, Borel JP. Non-enzymatic degradation of acid-soluble calf skin collagen by superoxide ion: protective effect of flavonoids. Biochem Pharmacol. 1983;32(1):53–8.

122. Buhimschi IA, Buhimschi CS, Pupkin M, Weiner CP. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. Am J Obstet Gynecol. 2003;189(1):181–8.

123. Lappas M, Permezel M, Rice GE. N-Acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and nuclear factor-kappaB deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(4):1723–9.

124. Shen Z, Jiao K, Teng M, Li Z. Activation of STAT-3 signalling by RECK downregulation via ROS is involved in the 27-hydroxycholesterol-induced invasion in breast cancer cells. Free Radic Res. 2020;54(2–3):126–36.

ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Zdeslav Benzon

**Adresa:** Klinika za ženske bolesti i porode, KBC Split
Spinčićeva 1, 21000 Split
Tel 021 551-453; Mob 0915294318
E-mail: zdeslav.benzon@gmail.com

**Rođen:** 11.07.1968. u Splitu

**Obrazovanje:**
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu - Studij u Splitu (1992.)
Specijalistički ispit iz ginekologije i porodništva - KBC Zagreb (2002.) Subspecijalizacija iz fetalne medicine i opstetricije (2016.)

**Zaposlenje:**
Dom zdravlja Split (1994)
Hitna medicinska pomoć (1995-1996)
Klinika za ženske bolesti i porode, KBC Split (1996-2008)
Poliklinika Sunce (2008-2012)
Klinika za ženske bolesti i porode , KBC Split (2012- )

**Akademski stupnjevi i napredovanje:**
Završen poslijediplomski doktorski studij Kliničke medicine utemeljene na dokazima (2006.) na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu

**Znanstveno nastavno napredovanje:**
Izbor u suradničko zvanje asistenta na Katedri za ginekologiju i porodništvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu

**Sudjelovanje u nastavi:**
Dodiplomska nastava – asistent na Katedri za ginekologiju i porodništvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.
Predavač na Katedri za ginekologiju i porodništvo Sveučilišnog odjela zdravstvenih studija u Splitu

**Publiciranje:**

**Radovi objavljeni u CC indeksiranim časopisima:**

1. Benzon Z, Prusac IK, Zekic S, Vulić M. Immunohistochemical expression of RECK protein in placental membranes of the preterm delivery with or without chorioamnionitis. Histol Histhopatol 2014;29(5):629-33.
2. Benzon S, Zekić-Tomaš S, Benzon Z, Vulić M, Kuzmić-Prusac I. Involvment of T lymphocytes in the placentae with villitis of unknown etiology from pregnancies complicated with preeclampsia. J Matern Fetal Neonatal 2016;29(7)1055-60.
3. Benzon Z, Benzon S, Tomaš SZ, Prusac IK, Vulić L, Vulić M, Stefanovic V. Immunohistochemical demonstration of RECK protein and interleukin-6 in fetal membranes from singleton pregnancies with late preterm delivery, intact membranes and histological chorioamnionitis. Biotech Histochem 2018;19:1-6.
4. Benzon Z, Prusac IK, Tomaš SZ, Vulić M, Vulić L, Benzon S, Stefanovic V. Chorioamnionitis has no impact on immunohistochemical expression of IL-6 in placental membranes of the late preterm delivery regardless of the membrane status. Journal of Perinatal Medicine 2021, in press.

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

1. Pušić TV, Roje D, Šain M, Benzon S, Benzon Z, Radić J. The overview of four patient with postpartal hemolytic-uremic syndrom. Gynaecol Perinatol 2013;22(3):157-9.
2. Vulić M, Roje D, Meštrović Z, Benzon Z, Radić A. Intrapartum electronic fetal heart rate monitoring. Gynaecol Perinatol 2013;22(suppl. 1):60–64
3. Roje D, Vulić M, Meštrović Z, Benzon Z, Radić A. ST analysis of the fetal electrocardiogram for intrapartum monitoring (STAN®SYSTEM) | [Intrapartalni nadzor analizom st spojnice fetalnog elektrokardiograma (STAN®SISTEM)]. Gynaecol Perinatol 2013;22:60-4.
4. Vulić M, Roje D, Meštrović Z, Benzon Z, Radić A. Kardiotokografija u porođaju. Gynaecol Perinatol 2013;22(suppl. 1):51-5.
5. Vulić M, Roje D, Meštrović Z, Benzon Z, Mišerda A, Kopić D. Postoji li razlika u incidenciji preeklampsije u blizanačkim trudnoćama nastalim spontano ili postupkom potpomognute oplodnje. Gynaecol Perinatol 2014;23(2):49-53.

6. Vulic M, Roje D, Meštrović Z, Benzon Z, Kopić D, Pehlić M. Benigni tumori i trudnoća. Gynaecol Perinatol 2014;23:1-4.

7. Vulic M, Roje D, Meštrović Z, Benzon Z, Radić A, Benzon S. Laparoskopija u trudnoći. Gynaecol Perinatol 2014;23:4-7.

8. Vulić M, Lalić L, Benzon Z, Meštrović Z. A retrospective study of discordant twin growth in dichorionic twin pregnancies and risk of preterm delivery at Split University Hospital Centre: Three year expirience. Acta Clin Croatica 2017;56:1-5

9. Benzon Z, Benzon S. Komplikacije preeklampsije, sindromi hellp i press. Gynaecol Perinatol 2018;27(Suppl. 2):68-71.

10. Benzon S, Benzon Z, Vulić L, Vulić M. Severe preterm preeclampsia-associated posterior reversible encephalopathy syndrome. Medica Jadertina 2020;50(4):349-352.

11. Benzon Z, Jukić M, Perković M, Cambj Sapunar L, Šitum M, Benzon S. Multidisciplinary approach in the management of pregnancy with placenta accreta spectrum disorder - Case report. Medica Jadertina 2021;51(3):279-82.

**Sažeci objavljeni u indeksiranim publikacijama:**

1. Benzon S, Vulić M, Marušić J, Roje D, Kopić D, Zeljak M. Primjena rekombinantnog aktiviranog čimbenika VII kod poslijeporođajnog krvarenja. Gynaecol Perinatol 2010;19:126.

2. Benzon S, Vulić M, Benzon Z, Roje D, Vukušić-Pušić T. Instrumentalno dovršenje porođaja vaginalnim putem u KBC Split u dvogodišnjem razdoblju; naša iskustva. Gynaecol Perinatol 2013;22:97.

3. Benzon S, Benzon Z, Vulić M. Utječe li preeklampsija u trudnoćama s VUE na morbiditet novorođenčadi? Gynaecol Perinatol 2015;24:80.

4. Benzon Z, Benzon S, Rešić-Karara J, Vulić M. Prijevremeno dovršenje blizanačke trudnoće u trudnice s ekstremnim polihidramnijem jednog blizanca - prikaz slučaja. Gynaecol Perinatol 2016;25(suppl. 1):140.

**Strani jezici:**

Engleski (aktivno), njemački (pasivno)