Upalni citokini i apoptotski proces posteljica trudnoća kompliciranih preeklampsijom i HELLP sindromom

Marušić, Jelena

Doctoral thesis / Disertacija

2013

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:171:215658

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

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

Jelena Marušić

UPALNI CITOKINI I APOPTOTSKI PROCES POSTELJICA TRUDNOĆA KOMPLICIRANIH PREEKLAMPSIJOM I HELLP SINDROMOM

Doktorska disertacija

Split, 2013.

Sveučilište u Splitu

Medicinski fakultet

Jelena Marušić

UPALNI CITOKINI I APOPTOTSKI PROCES POSTELJICA TRUDNOĆA KOMPLICIRANIH PREEKLAMPSIJOM I HELLP SINDROMOM

Doktorska disertacija

Split, 2013.

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

Mentor: prof.dr.sc. Ivana Kuzmić Prusac

ZAHVALE

Hvala prof.dr.sc. Ivani Kuzmić Prusac i dr.sc. Sandri Zekić Tomaš na povjerenju i želji da se sa mnom upuste u ovu pustolovinu izrade moje doktorske disertacije. Hvala vam na svoj slobodi koju ste mi davale sve ovo vrijeme rada, a još više vam hvala na svim savjetima kojima ste me vraćale na „pravi put" kada sam se zbog te slobode izgubila.

Hvala vam na velikoj, nesebičnoj, prijateljskoj podršci.

Hvala onima koji su najzaslužniji da ova disertacija uopće postoji. Vjerojatno ne razumiju previše od onoga što ondje piše, ali da nije bilo njihove bezuvjetne ljubavi i svakodnevnog odricanja, ova disertacija nikad ne bi bila napisana.

Mojim najdražima - hvala i vama.

Doktorsku disertaciju posvećujem svom Tati čija me ljubav nosi i danas, iako ga već odavno nema pored mene.

Svaki dan mi sve više nedostaješ. Volim te.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA 1

1. UVOD 2

1.1 PREEKLAMPSIJA I HELLP SINDROM 2

1.2 POSTELJICA 3

1.2.1 Razvoj, građa i funkcija posteljice 3

1.2.2 Fiziologija trofoblasta 5

1.3 APOPTOZA 5

1.3.1 Proces apoptoze i životni ciklus trofoblasta 5

1.3.2 Apoptoza u trofoblastu trudnoća kompliciranih preeklampsijom i HELLP sindromom 6

1.4 CITOKINI 7

1.4.1 Citokini u normalnoj trudnoći, preeklampsiji i HELLP sindromu 7

1.4.2 Citokini i apoptoza 7

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE 9

3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA 10

3.1 MATERIJAL 10

3.2 METODE ISTRAŽIVANJA 11

3.2.1 Patohistološki pregled posteljice 11

3.2.2 Imunohistokemijska metoda 11

3.2.3 Statističke metode 14

4. REZULTATI 15

4.1 Demografska obilježja skupine 15

4.2 Izražaj upalnih citokina u trofoblastu, sincicijalnim čvorićima i decidui ispitivanih posteljica 16

4.3 Apoptotska aktivnost trofoblasta, sincicijalnih čvorića i decidue ispitivanih posteljica 17

4.4 Povezanost apoptotske aktivnosti i izražaja citokina u trofoblastu i decidui ispitivanih posteljica 18

4.5 Citomorfološke karakteristike ispitivanih posteljica 22

5. RASPRAVA 25

6. ZAKLJUČCI 33

7. SAŽETAK 34

8. SUMMARY 36

9. LITERATURA 38

10. ŽIVOTOPIS 44

POPIS KRATICA

PE – preeklampsija

HELLP – **H**emolysis, **E**levated **L**iver enzymes and **L**ow **P**latlet count sindrom

TB – trofoblast

CTB – citotrofoblast

STB – sinciciotrofoblast

SČ – sincicijalni čvorić

IL-6 – interleukin 6

TNF-α – tumor nekrotizirajući čimbenik alfa

IL-10 – interleukin 10

AI – apoptotski indeks

HE – hemalaun-eozin

IHK – imunohistokemija

1. UVOD

1.1 PREEKLAMPSIJA I HELLP SINDROM

Preeklampsija (PE) je poremećaj nepoznate etiologije, specifičan za trudnoću, koji karakterizira novonastala hipertenzija i proteinurija nakon 20. tjedna trudnoće u prethodno normotenzivnih žena. PE se javlja u 2-8% svih trudnoća i vodeći je uzrok maternalnog i fetalnog morbiditeta i mortaliteta (1, 2). Na osnovi vrijednosti povišenog krvnog tlaka i proteinurije, te prisutnosti simptoma zahvaćenosti drugih organskih sustava razlikujemo blagu i tešku PE (3).

HELLP (*engl. **H**aemolysis, **E**levated **L**iver enzymes and **L**ow **P**latelet count syndrome*) sindrom je oblik teške PE karakteriziran hemolizom, povišenim vrijednostima jetrenih enzima i trombocitopenijom. Prvi put ga kao zaseban poremećaj u trudnoći opisuje Weinstein 1982. godine (4). Pojavljuje se u 0,5 do 0,9 % svih trudnoća te u 10 do 20% teških PE. HELLP sindom se najčešće javlja prijevremeno, između 28. i 37. tjedna trudnoće, a rjeđe u terminskim trudnoćama (5). Sindrom je povezan s još većim perinatalnim i maternalnim morbiditetom i mortalitetom u odnosu na PE (6). U nekim slučajevima HELLP sindroma izostaje popratna hipertenzija i proteinurija pa ga neki autori smatraju izdvojenim fenomenom u odnosu na PE (6).

Unatoč brojnim istraživanjima u posljednjem desetljeću, uzrok nastanka PE nije u potpunosti razjašnjen pa se PE često naziva „bolest teorija". Prema današnjim spoznajama različiti vaskularni, imunološki, genetski i okolišni čimbenici dovode do poremećenog razvoja posteljice, što rezultira poremećajem posteljične cirkulacije, otpuštanjem brojnih toksičnih čimbenika iz posteljice u cirkulaciju majke, generaliziranim oštećenjem endotela majke te svim simptomima karaterističnim za PE i HELLP sindrom (7). PE se češće javlja u prvorotki, u trudnoćama iz medicinski potpomognute oplodnje i u žena s autoimunim bolestima, što upućuje na mogući imunološki poremećaj u nastanku PE (8). HELLP sindrom se češće javlja u starijih trudnica i u višerotki, što ukazuje na različitost tih dvaju entiteta (9).

Prema današnjim spoznajama, PE se razvija u dva stadija: 1) rani, tzv. placentarni stadij, poremećene placentacije i invazije trofoblasta; 2) kasni, tzv. sistemski stadij, koji karakterizira sistemska maternalna bolest, u čijoj je osnovi upala i oštećenje endotela (10, 11). Iako je patofiziologija nastanka PE i HELLP sindroma još uvijek nepoznata, jasno je da je prisutnost posteljice osnova za nastanak bolesti (12). Rođenjem djeteta, točnije rođenjem

posteljice, simptomi nestaju unutar 48-72 sata, a završetak trudnoće tj. porod, i dalje je jedini uspješan način „liječenja" PE i HELLP sindroma. Višeplodove trudnoće, trudnoće s više posteljičnog tkiva, praćene su ranijim i težim oblicima bolesti, a u trudnoćama bez ploda tzv. molarnim trudnoćama, također se mogu javiti simptomi bolesti, što jasno potvrđuje ulogu posteljice u nastanku tih bolesti (13).

Danas, unatoč brojnim istraživanjima PE i HELLP sindroma i iznimnom napretku perinatologije, još ne znamo razloge nastanka tih bolesti, ne možemo spriječiti njihovo pojavljivanje niti imamo metode preciznog predviđanja njihovog pojavljivanja. Kako je riječ o bolestima koje znatno doprinose lošem ishodu trudnoće i za majku i za novorođenče to je svaki doprinos njihovom razjašnjavanju od velikog značenja.

1.2 POSTELJICA

1.2.1 Razvoj, građa i funkcija posteljice

Posteljica je organ vezan za trudnoću koji dijele dva genetski različita organizma. Nastanak posteljice je vrlo složen proces koji počinje oplodnjom jajne stanice i daljnjim dijeljenjem zametka te stvaranjem blastociste petog dana nakon oplodnje. Blastocistu izvana oblaže trofoblast (TB) iz kojeg će kasnije nastati posteljica, a unutrašnjost ispunjava embrioblast iz kojeg nastaju plod i pupkovina. Šesti do sedmi dan nakon oplodnje dolazi do implantacije blastociste u sluznicu maternice (endometrij) i potom do daljnjeg umnažanja i rasta TB-a. Sluznica maternice se priprema u drugoj fazi menstruacijskog ciklusa za moguću implantaciju tako da njezine stanice u sebi nakupljaju glikogen i lipide te se endometrij preobražava u tzv. deciduu. Neposredno nakon implantacije razvijaju se posteljične resice (14).

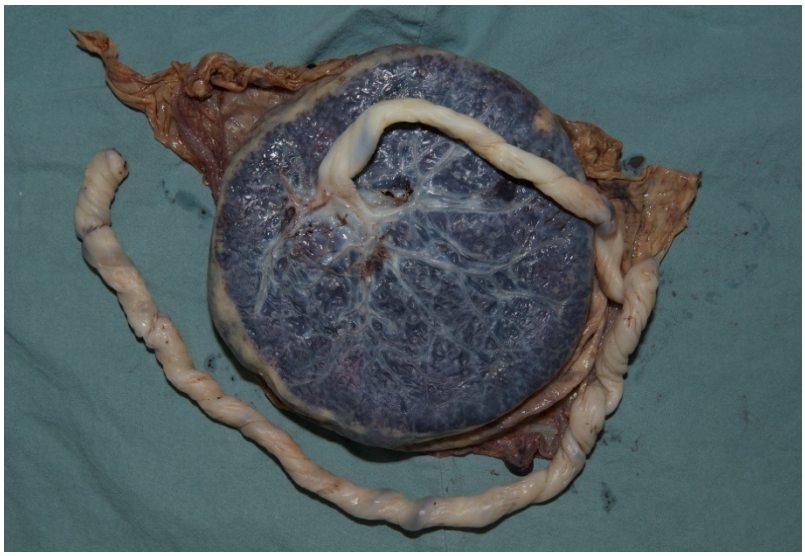
Na terminskoj posteljici razlikujemo: bazalnu ploču - maternalni dio posteljice (Slika 1.a) i korionsku ploču - fetalni dio posteljice (Slika 1.b). Histološki korionsku ploču čine stanice amniona, ogranci krvnih žila pupkovine i matične resice. Bazalnu ploču sačinjavaju stanice decidue, stanice ekstraviloznog TB-a i ogranci spiralnih arterija majke. Grananjem matičnih resica nastaje posteljično stablo unutar kojega razlikujemo: mezenhimalne resice, zrele i nezrele intermedijarne resice i terminalne resice. Terminalne resice su krajnji ogranci posteljičnih resica preko kojih se izmjenjuju tvari između majke i ploda. Resicu tvori stroma (fibroblasti, fetalne krvne žile, resični makrofagi) te pokrovni epitel (trofoblast) (Slika 2.). Trofoblast koji prekriva resice naziva se vilozni trofoblast, a sastoji se od unutrašnjeg sloja

citotrofoblasta (CTB) i vanjskog sloja sinciciotrofoblasta (STB) (15). Na vrhovima terminalnih resica nalazimo sincicijalne čvoriće (SČ) građene od više jezgara unutar jedinstvene citoplazme, koji se postupno otpuštaju u majčinu cirkulaciju. Postoji i tzv. intermedijarni ili ekstravilozni TB koji aktivno urasta u deciduu čiji je zadatak pretvorba spiralnih arterija maternice u uteroplacentarne krvne žile (16).

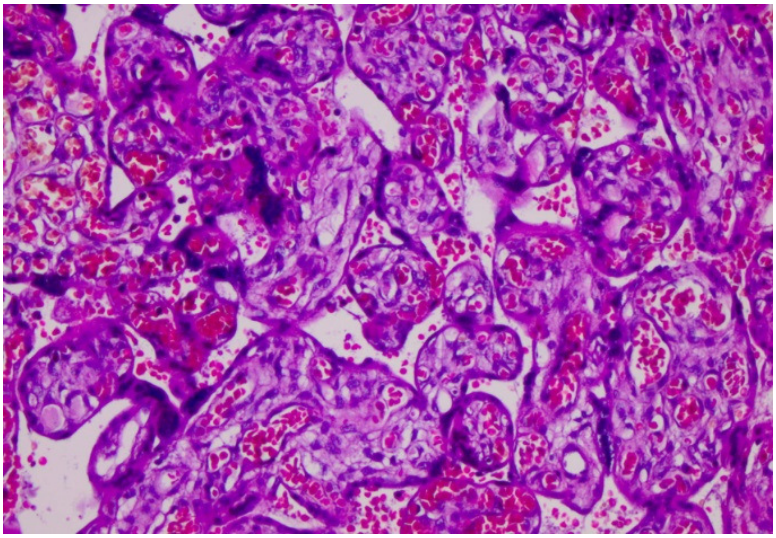
Od svog nastanka posteljica obavlja brojne funkcije: respiratornu, metaboličku, endokrinološku i niz drugih koje su važne za rast i razvoj fetusa (17).



Slika 1.a) Makroskopski prikaz maternalne strane terminske posteljice iz uredne trudnoće



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



Slika 2. Mikroskopski prikaz posteljičnih resica terminske posteljice iz uredne trudnoće (HE x 200)

1.2.2 Fiziologija trofoblasta

Normalan životni ciklus TB-a počinje proliferacijom CTB-a, nakon čega se neke od novonastalih stanica diferenciraju, dok preostale ostaju u sloju CTB-a kao matične stanice za novu diobu. Nakon diferencijacije stanica slijedi fuzija njihovih citoplazmi i formiranje jedinstvenog multinuklearnog sincicija tzv. STB-a. Unutar novonastalog STB-a događaju se važni metabolički procesi. „Starenjem" STB-a dolazi do pomicanja njihovih jezgara prema vrhovima resica i stvaranja SČ-a. Oni se postupno otpuštaju u majčinu cirkulaciju i uklanjaju u plućima uz pomoć plućnih makrofaga (18, 19).

1.3 APOPTOZA

1.3.1 Proces apoptoze i životni ciklus trofoblasta

Apoptoza je poseban oblik stanične smrti neophodan u razvoju organizma i održavanju ravnoteže normalnog tkiva tijekom života, a kako je riječ o aktivnom procesu koji zahtijeva potrošnju energije i aktivaciju određenih gena, naziva se još i programirana stanična smrt (20). Apoptoza stanice može se pokrenuti unutarnjim ili vanjskim putem. Unutarnji put pokreće nakupljanje proteina p53 u citoplazmi, nakon oštećenja stanične DNA, što mijenja odnos proapoptotskih i antiapoptotski proteina u korist proapoptotskih, pa u konačnici dolazi do otpuštanja citokroma c i drugih čimbenika apoptoze iz mitohondrija u citoplazmu. Vanjski put podrazumijeva vezivanje stimulatora apoptoze na receptore u staničnoj membrani. Zajednički rezultat unutarnjeg i vanjskog puta je kaskadna aktivacija skupine citoplazmatskih

enzima tzv. kaspaza što dovodi do cijepanja ciljnih proteina, te stanicu nepovratno vodi u smrt. Ostaci stanice nakon završetka apoptoze nazivaju se apoptotska tjelešca, koja konačno „tiho" nestaju procesom fagocitoze, ne izazivajući nikakav upalni odgovor (21-23). Poremećaji apoptoze vezani su uz etiopatogenezu bolesti poput tumora, nekih autoimunih bolesti (reumatoidni artritis, sistemski lupus eritematozus), degenerativnim procesima (Alzheimerova bolest), AIDS, ishemična oštećenja (infarkti), razvojne anomalije itd. Rezultati istraživanja apoptoze stvorili su nove mogućnosti za liječenje različitih bolesti.

Apoptoza igra ključnu ulogu u životnom ciklusu TB-a. Aktivacija apoptoze je neophodna za fuziju stanica CTB-a i formiranje STB-a, te za formiranje SČ-a kao završnih produkata apoptoze TB-a (24). Blokiranjem prokaspaze 8 *in vitro* može se spriječiti fuzija stanica CTB-a u STB. Jezgre stanica CTB-a ulaskom u STB gube mogućnost daljnje diobe, ali zadržavaju metaboličku aktivnost koja slabi s progresijom apoptoze. Pokrenuta apoptoza vodi stanicu u smrt tijekom 24 sata, dok započeta apoptoza TB-a traje oko 25 dana, koliko traje cijeli njegov životni ciklus (25-27). Usporena apoptotska zbivanja u TB-u rezultat su pojačanog izražaja antiapoptotskih čimbenika u odnosu prema ostalim tkivima (28). Apoptozom usmrćene jezgre s pripadajućom citoplazmom u obliku apoptotskih tjelešaca tzv. SČ-a otpuštaju se od STB-a mehanizmom sličnim egzocitozi, čime završava životni ciklus TB-a (29). Apoptozom prerađene stanice sasvim su imunološki inertne i u fiziološkim uvjetima, u normalnim trudnoćama ne izazivaju imunološku reakciju majke.

1.3.2 Apoptoza u trofoblastu trudnoća kompliciranih preeklampsijom i HELLP sindromom

Posljednjih se godina intenzivno proučava moguća uloga apoptotskih procesa TB-a u nastanku PE i HELLP sindroma. Naime, u posteljicama s PE i HELLP sindromom dokazana je povećana i ubrzana apoptoza koja dovodi do pojačanog otpuštanje elemenata TB-a u majčinu cirkulaciju (30, 31), što se naziva ubrzanim životnim ciklusom TB-a (*engl. „trophoblast turnover").* U PE i HELLP-u dokazan je ne samo veći broj SČ-a u majčinoj cirkulaciji nego je i njihova građa poremećena. Naime, SČ-i u PE i HELLP sindromu nastaju kao produkt patološke apoptoze tzv. aponekroze (32). U tim se slučajevima u intervilozni prostor oslobađa neadekvatno prerađeni TB, koji izaziva sistemsku upalnu i imunološku reakciju u majčinom organizmu. Uzrok ubrzanoj i neprimjerenoj apoptozi TB-a kod PE i HELLP sindroma nije poznat (22).

1.4 CITOKINI

1.4.1 Citokini u normalnoj trudnoći, preeklampsiji i HELLP sindromu

Citokini su signalne molekule koje imaju ključnu ulogu u funkcioniranju imunološkog sustava i sudjeluju u brojnim procesima u trudnoći počevši od implantacije i placentacije pa do početka poroda. Posteljica stvara i izlučuje brojne citokine tijekom trudnoće koji su uključeni u pet temeljnih procesa u posteljici: 1) u imunološki dijalog između majke i posteljice; 2) u invaziju i diferencijaciju TB-a; 3) u proliferaciju i apoptozu stanica posteljice; 4) u endokrinološku i metaboličku homeostazu i u 5) angiogenezu (33). Dinamika izlučivanja citokina mijenja se tijekom trudnoće, što upućuje na njihovu specifičnu ulogu u različitim fazama trudnoće (34, 35). Stanice TB-a proizvode najviše citokina, iako ih stvaraju i stanice decidue, stanice posteljičnih ovoja, te leukociti koji se ondje nalaze. Citokini se prema učinku dijele na proupalne i protupalne citokine. Interleukin 6 (IL-6) i tumor nekrotizirajući čimbenik alfa (TNF-α) pripadaju među proupalne citokine, a imaju i proapoptotski učinak, dok interleukin 10 (IL-10) djeluje protuupalno i antiapoptotski (36).

Pred desetak godina prvi put je uočena povezanost između kliničkih simptoma PE i pojačanog upalnog odgovora majke posredovanog citokinima (10). TNF-α i IL-6 povišeni su u serumu trudnica u normalnoj trudnoći, a u pacijentica s PE njihova je razina još veća (37). Dosadašnje studije o izražaju TNF-α i IL-6 u posteljicama obavljale su se na viloznom TB-u, a vrlo rijetko na decidui. Rezultati tih istraživanja su proturječni zato što su neke studije pronašle pojačan izražaj tih citokina u posteljicama s PE, dok druge ne nalaze tu razliku (38-40). Većina radova pokazala je smanjenu koncentraciju protuupalnog citokina IL-10 u serumu trudnica, kao i smanjeni izražaj u TB-u posteljica pacijentica s PE, iako neki radovi pokazuju pojačan izražaj IL-10 u TB-u (38, 41). Jedina studija koja zasebno analizira izražaj citokina u posteljicama s HELLP sindromom ukazuje na povećan izražaj IL-10, no u studiji se analizirao mali broj posteljica pa je prisutna velika razlika u gestacijskoj dobi između ispitivane i kontrolne skupine posteljica (42).

1.4.2 Citokini i apoptoza

Na posteljicama prvog tromjesječja uočeno je da povećano stvaranje proupalnog citokina TNF-α povećava apoptozu TB-a, dok protuupalni citokin IL-10 smanjuje apoptotski učinak (43). Takav proapoptotski učinak TNF-α je pokazan i na kulturama stanica CTB-a i STB-a (44).

Dosadašnja istraživanja vezana za izražaj citokina u posteljicama s PE dala su oprečne rezultate, a zasebna istraživanja izražaja citokina u posteljicama s HELLP sindromom gotovo ne postoje. Oprečnim rezultatima znatno su pridonijeli nejasni i neujednačeni kriteriji za dijagnozu PE, neizdvajanje HELLP sindroma kao zasebnog entiteta, mali broj analiziranih uzoraka posteljica i neusklađenost skupina prema trajanju trudnoće jer je poznato da se izlučivanje citokina znatno mijenja s trajanjem trudnoće (34, 35).

Nijedno istraživanje do sada nije jasno razlučilo koje stanice posteljice imaju veći izražaj upalnih citokina: stanice viloznog TB-a, sami SČ-i ili stanice decidue.

Spoznaje u vezi s povezanošću izražaja citokina i apoptoze u viloznom TB-u i decidui posteljica s PE vrlo su oskudna i dobivena su na posteljičnim eksplantatima ili TB-u prvog tromjesječja. Istraživanja o povezanosti izražaja citokina i apoptoze u posteljicama s HELLP sindromom nisu do sada objavljena.

Prema uvidu u dostupnu literaturu istraživanja o citomorfološkim karakteristikama SČ-a posteljica iz trudnoća kompliciranih PE i HELLP sindromom ne postoje.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

Glavni cilj istraživanja je ispitati izražaj upalnih citokina i povezanost s apoptotskim procesom posteljica trudnoća kompliciranih PE i HELLP sindromom pa se u tom smislu istražuje sljedeće:

1. Izražaj TNF-α, IL-6 i IL-10 u viloznom TB-u, SČ-ima i decidui bazalis posteljica trudnoća kompliciranih PE, HELLP sindromom i posteljicama kontrolne skupine.

Očekuje se povećan izražaj TNF-α i IL-6, te da je izražaj IL-10 smanjen u posteljicama ispitivanih skupina u odnosu na kontrolu, te da će ispitivani parametri biti izraženiji u posteljicama s HELLP sindromom (nego u PE).

2. Apoptoza svih segmenata viloznog TB-a (CTB, STB, SČ) i decidue bazalis posteljica trudnoća kompliciranih PE, HELLP sindromom i posteljica kontrolne skupine.

Pretpostavljamo da će apoptoza biti znatno veća u posteljicama ispitivanih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu, kao i da će biti puno veća u posteljicama s HELLP sindromom u odnosu na posteljice s PE. Očekujemo najaktivniju apoptozu u SČ-ima, zatim u STB-u, a najmanje aktivnu u CTB-u svih ispitivanih posteljica.

3. Povezanost apoptoze s izražajem citokina u posteljicama trudnoća kompliciranih PE, HELLP sindromom i posteljicama kontrolne skupine.

Očekuje se postojanje značajne pozitivne korelacije u izražaju TNF-α i IL-6 s apoptozom, a značajna negativna korelacija izražaja IL-10 i apoptoze u posteljicama s PE i HELLP sindromom.

4. Citomorfološke karakteristike SČ-a posteljica trudnoća kompliciranih PE, HELLP sindromom i posteljica kontrolne skupine te postojanje povezanost istih s apoptotskim procesom.

Očekujemo veći broj SČ-a i veći broj jezgara u čvorićima posteljica s većim apoptotskim indeksom.

3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

3.1 MATERIJAL

Materijal predstavljaju posteljice iz poroda završenih carskim rezom koje su odabrane na temelju sljedećih kriterija:

A) kriteriji uključenja u studiju:

Klinička dijagnoza PE:

- arterijska hipertenzija u prethodno normotenzivnih žena (sistolički tlak ≥ 140 mmHg, dijastolički tlak ≥ 90 mmHg),
- proteinurija (≥300mg/24 satnom urinu ili ≥1+ na test traci za proteine u urinu) (3).

Klinička dijagnoza HELLP sindroma:

- hemoliza (LDH ≥ 600 IU/L),
- povišene vrijednosti jetrenih enzima (AST ≥ 70 IU/L),
- trombocitopenija (broj trombocita ≤ od 100 x 10^9/L) (45).

B) kriteriji isključenja iz studije:

- arterijska hipertenzija, te druge bolesti krvožilnog i bubrežnog sustava koje su postojale prije trudnoće,
- trombofilija,
- višeplodova trudnoća,
- dijabetes ili bilo koji drugi poremećaj trudnoće,
- klinički, laboratorijski znakovi sindroma intramnijske infekcije ili patohistološki nalaz chorioamnionitisa stadija 2 ili 3, gradusa >1 (46).

Kontrolna skupina posteljica: jednoplodna trudnoća završena carskim rezom bez kliničke dijagnoze PE i HELLP sindroma, u dobi trudnoće od 28. do 42. navršena tjedna. Za trudnoće do 37. tjedna uzet će se idiopatski prijevremeni porodi, oni bez kliničkih, laboratorijskih i patohistoloških znakova upale.

Na temelju rezultata prethodno objavljenog istraživanja koje je koristilo istu zavisnu varijablu kao i ova studija, to jest ispitivanje izražaja citokina na TB-u posteljica trudnoća

kompliciranih PE, odredili smo klinički značajnu razliku koja nam je poslužila za procjenu potrebne veličine uzorka (39). Da bi se analizom varijance uspješno identificirale umjerene razlike u izražaju citokina prema procjeni HSCORE-a između kontrolne i ispitivane skupine uz snagu 80% i razinu značajnosti od 0,05 bilo je potrebno najmanje 35 uzoraka posteljica po skupini. Procjena potrebne veličine uzorka provedena je uz pomoć računalnog programa G*Power 3.1.2.

3.2 METODE ISTRAŽIVANJA

3.2.1 Patohistološki pregled posteljice

Posteljice su fiksirane u 10% puferiranom formalinu. Uzorci tkiva uzeti su prema standardnom protokolu za preuzimanje tkiva posteljica: dva uzorka pupkovine i dva uzorka plodovih ovoja (jedan uzorak s mjesta prsnuća plodovih ovoja i jedan uzorak uz rub posteljične ploče), dva uzorka cijele debljine iz makroskopski urednog tkiva posteljice (jedan u blizini mjesta insercije pupkovine, drugi na pola puta između mjesta insercije pupkovine i ruba posteljice). Nakon obrade u histokinetu tkivo je uklopljeno u parafin i rezano rotacijskim mikrotomom na 4 μm, nakon čega je obojeno hemalaun-eozinom (HE). Za mikroskopsku analizu preparata koristio se mikroskop marke Olympus BX41. Mikroskopskim pregledom posteljice na 10 nasumice odabranih vidnih polja povećanja 400 puta odredio se: ukupan broj stanica CTB-a, broj jezgara u STB-u, broj resica, broj SČ-a, broj SČ-a na ukupan broj posteljičnih resica, broj jezgara u svakom SČ-u za svaki uzorak posteljice. Brojanje je obavljeno uz pomoć programa Cell D1 Image analysis (Olympus). Nakon patohistološkog pregleda posteljica specijaliste patologa specijaliziranog za ginekološku patologiju, u cilju objektivnosti rezultata, jedan patolog je određivao izražaj citokina HSCORE metodom, a drugi stupanj apoptoze apoptotskim indeksom.

3.2.2 Imunohistokemijska metoda (IHK)

Za imunohistokemijsku procjenu apoptoze i izražaja citokina koristio se isječak iz središnjeg dijela posteljice.

Parafinski rezovi iz središnjeg dijela posteljice postavljeni su na silanom (3-aminopropytriethoxysilane, Sigma) obrađena predmetna stakalca. Nakon deparafinizacije u ksilolu slijedila je rehidracija kroz alkohole sve niže koncentracije, te kuhanje u puferu (pH=9.0) 20 minuta u mikrovalnoj peći na maksimalnoj snazi od 700W. Nakon hlađenja preparata slijedilo je ispiranje destiliranom vodom dva puta i otopinom fosfatnog pufera

(PBS) tri puta. Daljnja obrada vršila se u automatskom bojaču (DAKO, Danska), a sastojala se od tretiranja preparata 3%-tnom otopinom vodikova peroksida u trajanju od 10 minuta i ispiranja u dvostruko destiliranoj vodi uz primjenu primarnih protutijela:

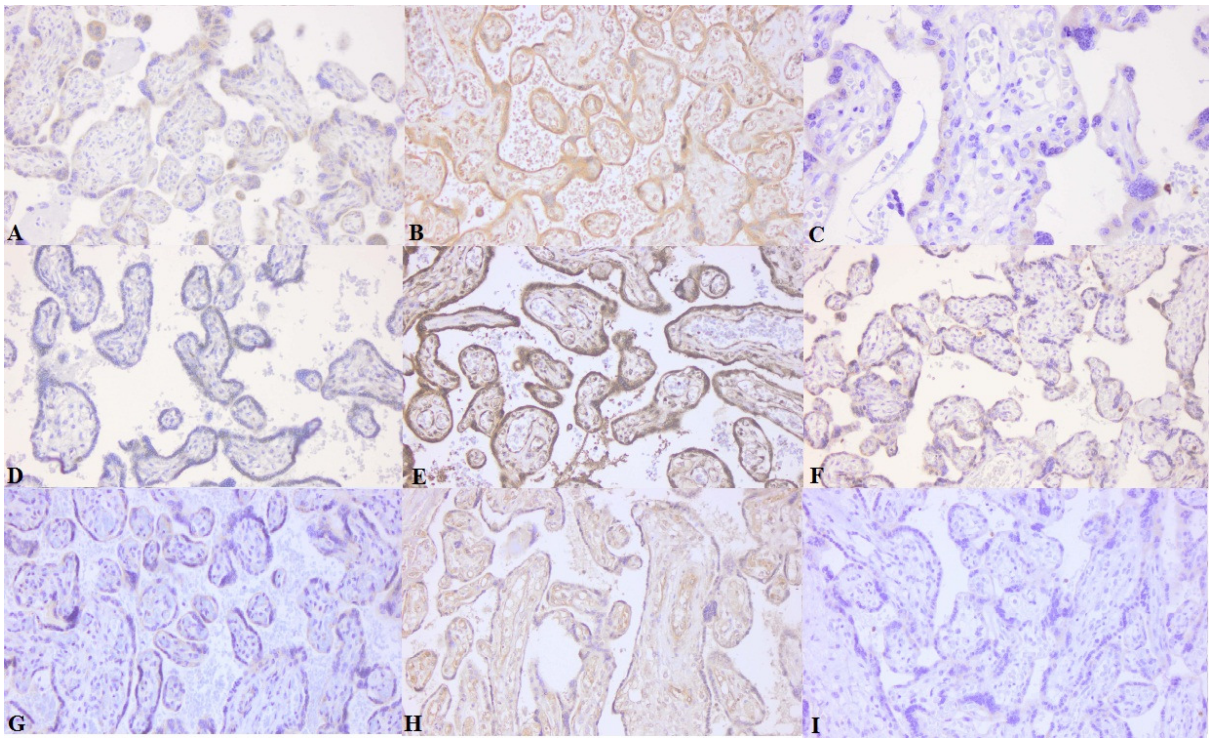
a) inkubacija primarnog mišjeg protutijela M30 (Roche Diagnostics, GmbH, klon M30) u razrjeđenju 1:200 tvorničkim razrjeđivačem (S2022 Antibody diluent, DAKO, Danska) tijekom dva sata
b) inkubacija primarnog mišjeg protutijela TNF-α (Thermo Scientific, Rockford, USA) u razrjeđenju 1:25 tvorničkim razrjeđivačem (S2022 Antibody diluent, DAKO, Danska) tijekom dva sata
c) inkubacija primarnog mišjeg protutijela IL-6 (Leica, Newcastle, UK) u razrjeđenju 1:50 tvorničkim razrjeđivačem (S2022 Antibody diluent, DAKO, Danska) tijekom dva sata
d) inkubacija primarnog štakorskog protutijela IL-10 (Thermo Scientific, Rockford, USA) u razrjeđenju 1:75 tvorničkim razrjeđivačem (S2022 Antibody diluent, DAKO, Danska) tijekom dva sata.

Slijedilo je ispiranje PBS-om i primjena sekundarnog protutijela (LSAB metoda, DAKO, Danska) u trajanju od 30 minuta te ponovno ispiranje PBS-om. Reakcija je vizualizirana primjenom kromogena diaminobenzidina (DAB, DAKO, Code No. K 3468, Glostrup, Danska) i supstrata (na 1 ml supstrata/1 kap kromogena) koji se inkubirao tijekom 10 minuta, isprao u destiliranoj vodi tri puta te kontrastno obojio hematoksilinom. Završni korak bila je dehidratacija u gradijentu 96% i 100% alkohola, tretiranje ksilolom i pokrivanje kanada balzamom i pokrovnicom.

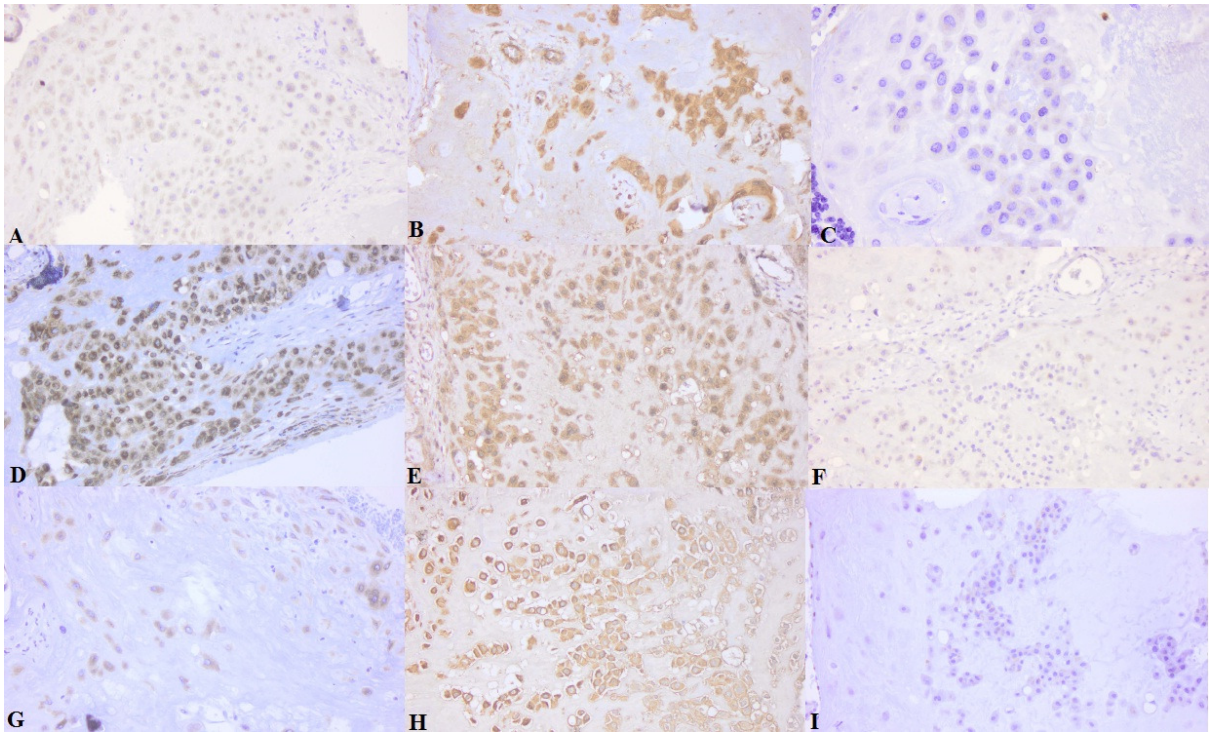
Apoptotske stanice nakon primjene M30 protutijela bile su intenzivno smeđe difuzno ili granularno citoplazmatski obojene. Pozitivna kontrola bili su preparati karcinoma debelog crijeva. Pozitivnom reakcijom za TNF-α, IL-6 i IL-10 smatrala se smeđa obojenost citoplazme stanica TB-a i decidue. Kod STB-a pozitivnom stanicom smatrala se jezgra okružena obojenom citoplazmom. Pozitivna kontrola bio je preparat tkiva dojke za TNF-α, preparat tkiva crijeva za IL-6 te preparat tkiva tonzile za IL-10.

Uporabom protutijela M30 ispitala se apoptoza u CTB-u, STB-u, SČ-ima i decidui bazalis, uz napomenu da se u STB-u i SČ-ima broje jezgre. Apoptoza je izražena kao apoptotski indeks (AI) - broj pozitivnih stanica na ukupni broj stanica x 100 (47).

Uporabom TNF-α i IL-6 protutijela ispitao se izražaj proupalnih citokina, a uporabom protutijela IL-10 izražaj protuupalnog citokina u viloznom TB-u i SČ-ima (Slika 3.) te u decidualnim stanicama decidue bazalis (Slika 4.). Izražaj citokina je prikazan HSCORE-om, koji se računa prema formuli: HSCORE=ΣPi (i+1), gdje oznaka „i" predstavlja intenzitet obojenja procijenjen sa 1, 2, ili 3 (slabo, umjereno ili jako), a „Pi" umnožak postotaka obojenja svakog intenziteta (48).



Slika 3. Izražaj upalnih citokina IL-6, IL-10 i TNF-α u viloznom trofoblastu i sincicijalnim čvorićima posteljica s HELLP sindromom, preeklampsijom i kontrolnim posteljicama. (A-C) Izražaj IL-6, IL-10 i TNF-α u viloznom trofoblastu i sincicijalnim čvorićima posteljica s HELLP sindromom. (D-F) Izražaj IL-6, IL-10 i TNF-α u viloznom trofoblastu i sincicijalnim čvorićima posteljica s preeklampsijom. (G-I) Izražaj IL-6, IL-10 i TNF-α u viloznom trofoblastu i sincicijalnim čvorićima posteljica kontrolne skupine (IHK x 200).



Slika 4. Izražaj upalnih citokina IL-6, IL-10 i TNF-α u decidui bazalis posteljica s HELLP sindromom, preeklampsijom i kontrolnim posteljicama. (A-C) Izražaj IL-6, IL-10 i TNF-α u decidui posteljica s HELLP sindromom. (D-F) Izražaj IL-6, IL-10 i TNF-α u decidui posteljica s preeklampsijom. (G-I) Izražaj IL-6, IL-10 i TNF-α u decidui posteljica kontrolne (IHK x 200).

3.2.3 Statističke metode

Normalitet distribucija svih kvantitativnih varijabli provjerili smo Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Mjere centralne tendencije i varijabiliteta ispitivanih varijabli za tri ispitivane skupine opisali smo aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom (normalno raspodjeljene varijable). Razlike triju ispitivanih skupina (HELLP, PE, kontrola) u kvantitativnim varijablama mjerenim kontinuiranim ljestvicama (vrijednosti TNF-α, IL-6, IL-10, apoptotski indeks te kvantitativne karakteristike čvorića) ispitali smo jednosmjernom analizom varijance i Tukeyevim post-hoc testom (normalno raspodijeljene varijable). Za ispitivanje povezanosti kontinuiranih varijabli koristili smo Pearsonov r koeficijent (normalno raspodijeljene varijable). Za sve usporedbe razina statističke značajnosti je postavljena na $P<0,05$, a za obradu rezultata koristili smo IBM SPSS Statistics v.19 for Windows.

4. REZULTATI

U Klinici za ženske bolesti i porode KBC Split poštujući kriterije uključenja i isključenja iz studije, prikupljene su posteljice i podaci iz 35 trudnoća kompliciranih PE, 35 trudnoća kompliciranih HELLP sindromom i 35 kontrolnih trudnoća. Obrada i analiza posteljica učinjena je na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split.

4.1 Demografska obilježja skupine

Nije pronađena statistički značajna razlika između rodilja ispitivanih skupina prema životnoj dobi, Tablica 1 (F=0,26; P=0,77). Paritet se statistički razlikovao između rodilja ispitivanih skupina, Tablica 1 (F=4,5; P=0,01). Post-hoc usporedbom (Tukey-ev test) pokazano je statistički značajno više višerotkinja u kontrolnoj skupini u odnosu na skupinu s PE (P<0,01), dok razlika u paritetu između rodilja s HELLP sindromom i PE (P=0,29) te rodilja s HELLP sindromom i kontrola nije značajna (P=0,29). Nije pronađena statistički značajna razlika između rodilja ispitivanih skupina prema gestacijskoj dobi, Tablica 1 (F=1,04; P=0,36). Indeks tjelesne mase uvelike se statistički razlikovao između rodilja ispitivanih skupina, Tablica 1 (F=12,5; P<0,001). Post-hoc usporedbom (Tukey-ev test) pokazano je da rodilje s PE imaju značajno veći indeks tjelesne mase od rodilja s HELLP sindromom (P=0,01) te da rodilje s PE imaju statistički značajno veći indeks tjelesne mase od rodilja kontrolne skupine (P<0,001), dok razlika u indeksu tjelesne mase između rodilja s HELLP sindromom i kontrola nije značajna (P=0,09). Sistolički krvni tlak u velikoj se mjeri statistički razlikovao između rodilja ispitivanih skupina, Tablica 1 (F=125,0; P<0,001). Post-hoc usporedbom (Tukey-ev test) pokazan je viši sistolički krvni tlak kod rodilja s PE nego kod rodilja s HELLP sindromom (P<0,001), viši sistolički krvni tlak kod rodilja s PE nego kod kontrola (P<0,001) i viši sistolički krvni tlak kod rodilja s HELLP sindromom nego kod kontrola (P<0,001). Dijastolički krvni tlak značajno se statistički razlikovao između rodilja ispitivanih skupina, Tablica 1 (F=103,9; P<0,001). Post-hoc usporedbom (Tukey-ev test) pokazan je viši dijastolički krvni tlak kod rodilja s PE nego kod rodilja s HELLP sindromom (P<0,01), viši dijastolički krvni tlak kod rodilja s PE nego kod kontrola (P<0,001) i viši dijastolički krvni tlak kod rodilja s HELLP sindromom nego kod kontrola (P<0,001). Porođajna težina novorođenčadi značajno se statistički razlikovala između ispitivanih skupina, Tablica 1 (F=10,8; P<0,001). Post-hoc usporedbom (Tukey-ev test) pokazano je da su novorođenčad iz trudnoća s PE značajno manje porođajne težine u odnosu na novorođenčad kontrola

(P<0,001) te da su novorođenčad iz trudnoća s HELLP sindromom značajno manje porođajne težine u odnosu na novorođenčad iz kontrola (P<0,001), dok razlika u porođajnim težinama između novorođenčadi iz trudnoća s PE i novorođenčadi iz trudnoća s HELLP sindromom nije statistički značajna (P=0,99).

Tablica 1. Demografska obilježja ispitivanih skupina

	PE (n=35)	HELLP (n=35)	Kontrola (n=35)	P [a]
Dob rodilje (godina)	29,2±5,7	30,1±6,7	29,9±5,2	NS
Paritet (broj djece)	1,3±0,5	1,6±1,1	1,9±1,0	0,01
Gestacijska dob (tjedan)	33,2±2,7	32,7±3,3	33,7±2,8	NS
ITM (kg/m^2)	30,2±4,4	27,8±3,1	26,2±2,4	<0,001
sRR (mmHg)	172,6±10,4	158,0±21,7	118,8±8,2	<0,001
dRR (mmHg)	108,2±9,2	99,7±15,1	72,1±7,1	<0,001
Porođajna težina (gram)	1736,3±581,3	1727,1±629,0	2316,3±615,6	<0,001

ITM, indeks tjelesne mase; sRR, sistolički krvni tlak; dRR, dijastolički krvni tlak; NS, nema statistički značajne razlike. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost±standardna devijacija. [a] – ANOVA test.

4.2 Izražaj upalnih citokina u trofoblastu, sincicijalnim čvorićima i decidui ispitivanih posteljica

Izražaj citokina TNF-α, IL-6 i IL-10 proučen je zasebno na viloznom TB-u, SČ-ima i decidui bazalis uporabom prethodno objašnjene HSCORE metode. Izražaj citokina TNF-α nije se statistički značajno razlikovao između ispitivanih skupina posteljica u viloznom TB-u (P=0,365), SČ-ima (P=0,395) i decidui (P=0,317). Razlika u izražaju IL-6 u viloznom TB-u (P=0,321), SČ-ima (P=0,052) i decidui (P=0,149) ispitivanih skupina posteljica nije statistički značajna. Izražaj citokina IL-10 nije se statistički značajno razlikovao između

ispitivanih skupina posteljica u viloznom TB-u (P=0,309), SČ-ima (P=0,776) i decidui (P=0,642) (Tablica 2.).

Tablica 2. Izražaj citokina u viloznom trofoblastu, sincicijalnim čvorićima i decidui bazalis posteljica trudnoća kompliciranih PE, HELLP sindromom i kontrolnim posteljicama

	PE (n=35)	HELLP (n=35)	Kontrola (n=35)	P [a]
TNF-α				
Vilozni trofoblast	0,740±1,224	1,054±1,056	1,120±1,279	0,365
Sincicijalni čvorići	0,897±1,296	1,300±1,166	1,174±1,314	0,395
Decidua	1,317±1,292	1,774±1,152	1,563±1,316	0,317
IL-6				
Vilozni trofoblast	3,069±0,628	3,161±0,915	2,909±0,513	0,321
Sincicijalni čvorići	3,549±0,742	3,569±0,428	3,266±0,503	0,052
Decidua	3,800±0,300	3,834±0,318	3,663±0,504	0,149
IL-10				
Vilozni trofoblast	3,906±0,218	3,827±0,240	3,814±0,334	0,309
Sincicijalni čvorići	3,391±0,178	3,917±0,162	3,900±0,211	0,776
Decidua	3,960±0,150	3,959±0,117	3,926±0,230	0,642

TNF-α – tumor nekrotizirajući čimbenik alfa, IL-interleukin. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. [a] – ANOVA test.

4.3 Apoptotska aktivnost trofoblasta, sincicijalnih čvorića i decidue ispitivanih posteljica

Apoptotska aktivnost TB-a i decidue bazalis izražena je kao apoptotski indeks (AI), tj. kao broj pozitivnih stanica na ukupni broj stanica x 100, u slučaju STB-a kao broj jezgara okružen pozitivnom citoplazmom na ukupan broj jezgara x 100 (48). AI CTB-a (F=21,04;

P<0,001), STB-a (F=18,64; P<0,001), SČ-a (F=53,88; P<0,001), ukupnog TB-a (F=22,87; P<0,001) i decidue (F=53,5; P<0,001) statistički se značajno razlikovao između tri skupine ispitivanih posteljica (Tablica 3.). Post-hoc usporedbom (Tukey-ev test) pokazan je statistički značajno veći AI CTB-a u posteljicama s HELLP sindromom u odnosu na kontrolne posteljice (P<0,001) te statistički značajno veći AI CTB-a u posteljicama s PE u odnosu na kontrolne posteljice (P<0,001), dok razlika u AI CTB-a između posteljica s HELLP sindromom i posteljica s PE nije statistički značajna (P=0,08). Post-hoc usporedbom (Tukey-ev test) pokazan je statistički značajno veći AI STB-a u posteljicama s HELLP sindromom u odnosu na kontrolne posteljice (P<0,001) te statistički značajno veći AI STB-a u posteljicama s PE u odnosu na kontrolne posteljice (P<0,001), dok razlika u AI STB-a između posteljica s HELLP sindromom i posteljica s PE nije statistički značajna (P=0,76). Post-hoc usporedbom (Tukey-ev test) pokazan je statistički značajno veći AI SČ-a u posteljicama s HELLP sindromom u odnosu na posteljice s PE (P<0,001) i u odnosu na kontrolne posteljice (P<0,001) te statistički značajno veći AI SČ-a u posteljicama s PE u odnosu na kontrolne posteljice (P<0,01). AI ukupnog TB-a posteljica s HELLP sindromom statistički je značajno različit od AI ukupnog TB-a posteljica s PE (P=0,02) i AI ukupnog TB-a kontrolnih posteljica (P<0,001). AI ukupnog TB-a posteljica s PE statistički je značajno veći od AI ukupnog TB-a kontrolnih posteljica (P<0,001). Decidua posteljica s HELLP sindromom ima statistički značajno veći AI od decidue posteljica s PE (P<0,001) i decidue kontrolnih posteljica (P<0,001), također decidua posteljica s PE ima veći AI od decidue kontrolnih posteljica (P<0,001).

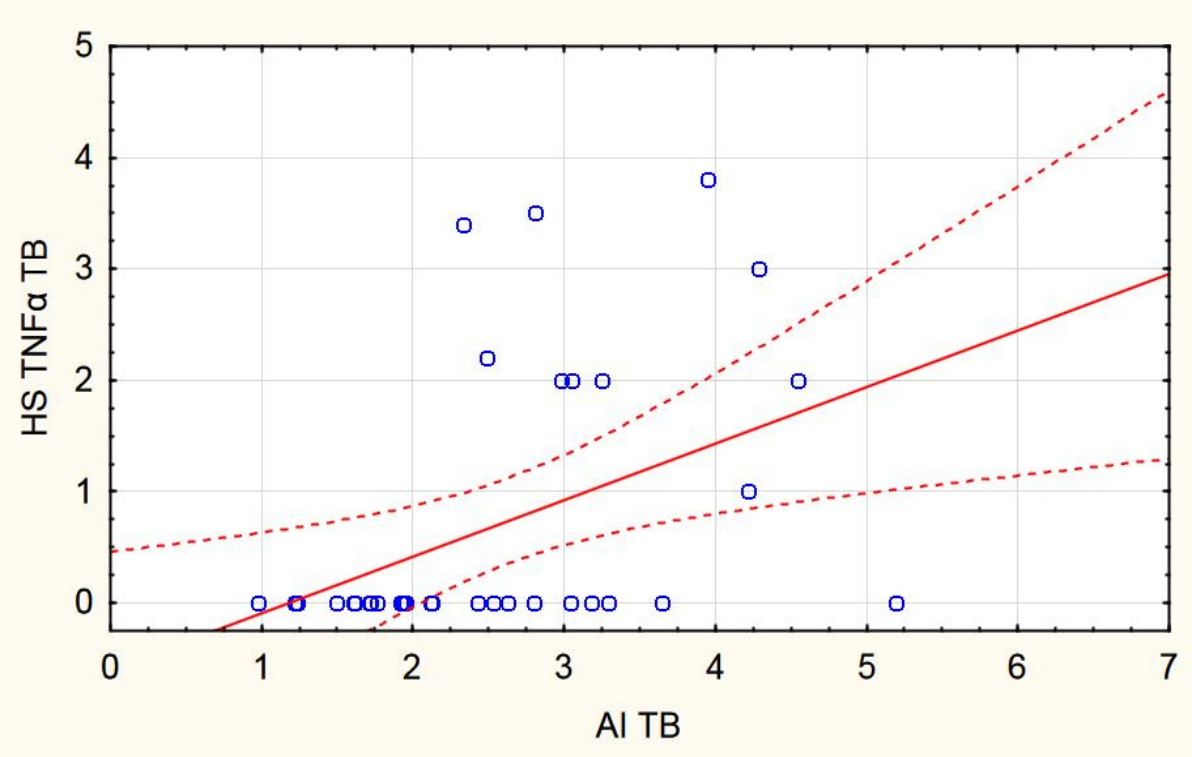
Tablica 3. Apoptoza u citotrofoblastu, sinciciotrofoblastu, sincicijalnim čvorićima i decidui posteljica trudnoća kompliciranih PE, HELLP sindromom i kontrolnim posteljicama

	PE (n=35)	HELLP (n=35)	Kontrola (n=35)	P [a]
AI citotrofoblasta	2,19±1,03	2,82±1,77	0,98±0,38	<0,001
AI sinciciotrofoblasta	3,76±2,62	4,10±2,26	1,39±0,57	<0,001
AI sincicijalnih čvorića	5,89±2,50	10,79±4,57	3,3±1,1	<0,001
AI ukupnog trofoblasta	2,63±1,05	3,59±2,25	1,24±0,5	<0,001
AI decidue	17,41±9,81	28,46±8,5	8,69±4,92	<0,001

AI - apoptotski indeks. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. [a] – ANOVA test.

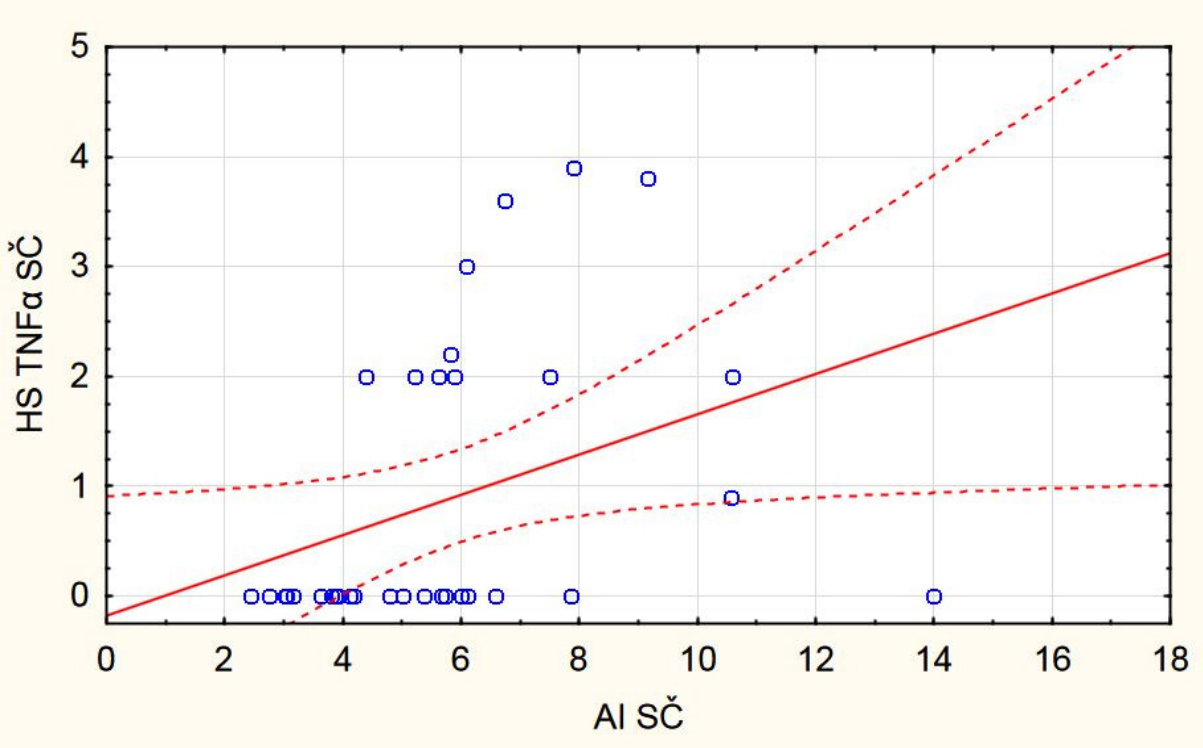
4.4 Povezanost apoptotske aktivnosti i izražaja citokina u trofoblastu i decidui ispitivanih posteljica

Korelacija izražaja upalnih citokina TNF-α (r=0,22; P=0,20), IL-6 (r=0,16; P=0,36) i IL-10 (r=0,04; P=0,82) u TB-u posteljica s HELLP sindromom i AI TB-a posteljica s HELLP sindromom nije statistički značajna. Korelacija izražaja upalnog citokina TNF-α u TB-u posteljica s PE (r=0,44; P=0,01) i AI TB-a posteljica s PE je u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji (Slika 5.), dok korelacija izražaja IL-6 (r=0,16; P=0,36) i IL-10 (r=0,04; P=0,82) u TB-u posteljica s PE i AI TB-a posteljica s PE nije statistički značajna.



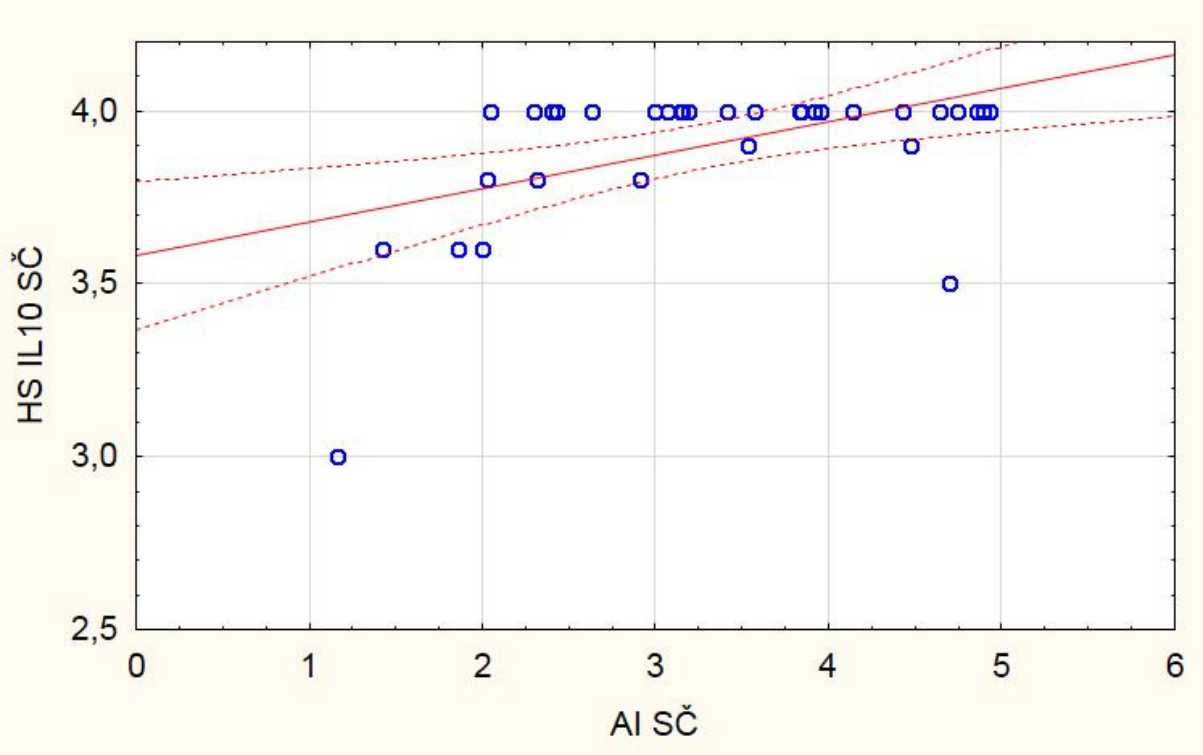
Slika 5. Korelacija izražaja TNF-α u trofoblastu i apoptotskog indeksa trofoblasta posteljica s preeklampsijom. Postoji statistički značajna pozitivna korelacija između navedenih varijabli (r=0,44; P=0,01).

Korelacija izražaja upalnih citokina TNF-α (r=0,23; P=0,18), IL-6 (r=0,14; P=0,41) i IL-10 (r=0,18; P=0,32) u TB-u kontrolnih posteljica i AI TB-a kontrolnih posteljica nije statistički značajna. Korelacija izražaja upalnih citokina TNF-α (r=0,17; P=0,32), IL-6 (r=0,21; P=0,24) i IL-10 (r=0,15; P=0,39) u SČ-ima posteljica s HELLP sindromom i AI SČ-a posteljica s HELLP sindromom nije statistički značajna. Korelacija izražaja upalnog citokina TNF-α u SČ-ima posteljica s PE (r=0,35; P=0,04) i AI SČ-a posteljica s PE je u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji (Slika 6.), dok korelacija izražaja IL-6 (r=0,28; P=0,11) i IL-10 (r=0,02; P=0,91) u SČ-ima posteljica s PE i AI SČ-a posteljica s PE nije statistički značajna.



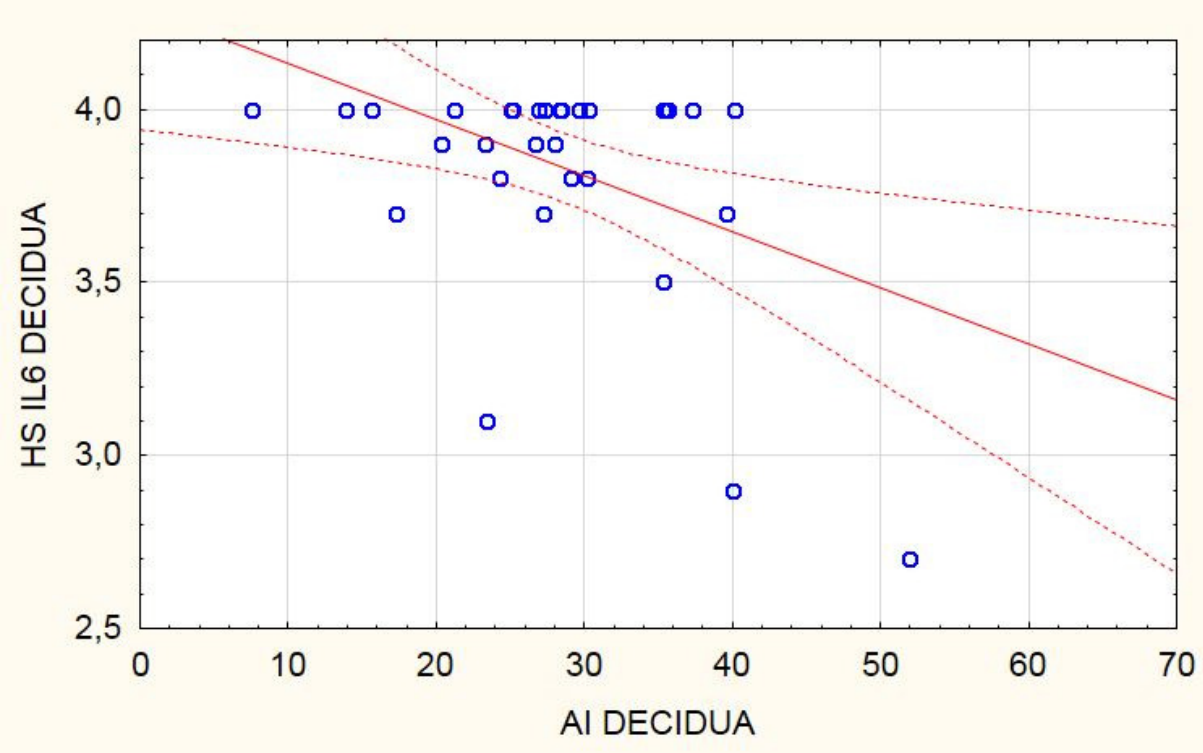
Slika 6. Korelacija izražaja TNF-α u sincicijalnim čvorićima i apoptotskog indeksa sincicijalnih čvorića posteljica s preeklampsijom. Postoji statistički značajna pozitivna korelacija između navedenih varijabli (r=0,35; P=0,04).

Korelacija izražaja upalnih citokina TNF-α (r=0,18; P=0,31), IL-6 (r=0,27; P=0,11) u SČ-ima kontrolnih posteljica i AI SČ-a kontrolnih posteljica nije statistički značajna, dok je korelacija izražaja IL-10 (r=0,48; P<0,01) u SČ-ima kontrolnih posteljica i AI SČ-a kontrolnih posteljica u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji (Slika 7.).



Slika 7. Korelacija izražaja IL-10 u sincicijalnim čvorićima i apoptotskog indeksa sincicijalnih čvorića kontrolnih posteljica. Postoji statistički značajna pozitivna korelacija između navedenih varijabli (r=0,48; P<0,01).

Korelacija izražaja upalnih citokina TNF-α (r=0,26; P=0,14) i IL-10 (r=0,12; P=0,49) u decidui posteljica s HELLP sindromom i AI decidue posteljica s HELLP sindromom nije statistički značajna, dok je korelacija izražaja IL-6 u decidui posteljica s HELLP sindromom (r= –0,43; P=0,01) i AI decidue posteljica s HELLP sindromom je u statistički značajnoj negativnoj korelaciji (Slika 8.). Korelacija izražaja upalnog citokina TNF-α (r=0,00; P=0,99), IL-6 (r=0,14, P=0,42) i IL-10 (r=0,09; P=0,59) u decidui posteljica s PE i AI decidue posteljica s PE nije statistički značajna**.** Korelacija izražaja upalnih citokina TNF-α (r=0,13; P=0,45), IL-6 (r=0,1; P=0,58) i IL-10 (r=0,03; P=0,87) u decidui kontrolnih posteljica i AI decidue kontrolnih posteljica nije statistički značajna.



Slika 8. Korelacija izražaja IL-6 u decidui i apoptotskog indeksa decidue posteljica s HELLP sindromom. Postoji statistički značajna negativna korelacija između navedenih varijabli (r= –0,43; P=0,01).

4.5 Citomorfološke karakteristike ispitivanih posteljica

Posteljice PE i HELLP sindroma nisu se statistički uvelike razlikovale prema broju resica u odnosu na posteljice kontrolne skupine, Tablica 4 (F=1,58; P=0,21). Statistički značajna razlika nađena je u broju SČ-a između ispitivanih skupina posteljica, Tablica 4 (F=38,16; P<0,001). Post-hoc usporedbom (Tukey-ev test) pokazan je statistički značajno veći broj SČ-a u posteljicama s HELLP sindromom u odnosu na posteljice s PE (P=0,006) i kontrolne posteljice (P<0,001) te statistički značajno veći broj SČ-a u posteljicama s PE u odnosu na kontrolne posteljice (P<0,001). Statistički značajna razlika nađena je i u omjeru broja SČ-a na broj resica između ispitivanih skupina posteljica, Tablica 4 (F=29,47; P<0,001). Post-hoc usporedbom (Tukey-ev test) pokazan je statistički značajno veći broj SČ-a na broj resica u posteljicama s HELLP sindromom u odnosu na posteljice s PE (P=0,001) i u odnosu na kontrolne posteljice (P<0,001) te statistički značajno veći broj SČ-a na broj resica u posteljicama s PE u odnosu na kontrolne posteljice (P<0,001). Statistički značajna razlika nađena je i u ukupnom broju jezgara u SČ-u, Tablica 4 (F=45,05; P<0,001) između

ispitivanih skupina posteljica. Post-hoc usporedbom (Tukey-ev test) pokazan je statistički značajno veći broj jezgara u SČ-u u posteljicama s HELLP sindromom u odnosu na posteljice s PE (P<0,001) i u odnosu na kontrolne posteljice (P<0,001) te statistički značajno veći broj jezgara u SČ-u u posteljicama s PE u odnosu na kontrolne posteljice (P<0,001).

Tablica 4. Citomorfološke karakteristike ispitivanih posteljica

	PE (n=35)	HELLP (n=35)	Kontrola (n=35)	P [a]
Broj resica	51,9±10,1	48,7±10,1	48,5±6,8	0,210
Broj SČ	32,1±9,1	38,4±8,6	21,1±7,3	<0,001
Broj SČ/broj resica	0,6±0,2	0,8±0,2	0,5±0,2	<0,001
Broj jezgara u SČ	516,9±118,3	669,9±140,9	370,2±136,0	<0,001

SČ - sincicijalni čvorić. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. [a] – ANOVA test.

5. RASPRAVA

PE i HELLP sindrom su multisistemske bolesti trudnoće koje su unatoč brojnim istraživanjima i danas nejasne etiologije, a čine vodeći uzrok perinatalnog i maternalnog morbiditeta i mortaliteta. Novija istraživanja usmjerena su na posteljicu, točnije na poremećenu apoptozu posteljice s PE i HELLP sindromom kao uzrokom njihova nastanka (12). Posljednjih godina istraživanja upućuju na generaliziranu upalnu reakciju kao moguće objašnjenje kliničkih simptoma tih bolesti (49).

Ovo istraživanje jasno je razdvojilo i zasebno analiziralo posteljice prema strogo definiranim kriterijima za PE i HELLP sindrom, što u literaturi često nije slučaj. Istraživanje je načinjeno na velikom broju uzoraka u odnosu na dosadašnja objavljena istraživanja o PE, a posebno u odnosu na rijetka istraživanja o HELLP sindromu.

Paritet se značajno razlikovao između rodilja ispitivanih skupina, naime u kontrolnoj skupini bilo je statistički značajno više višerotkinja u odnosu na skupinu s PE, dok razlika u paritetu između rodilja s HELLP sindromom i PE te rodilja s HELLP sindromom i kontrola nije bila statistički značajna. Na temelju epidemioloških istraživanja poznato je da se PE češće javlja u prvorotkinja, a HELLP sindrom u višerotkinja pa je dobiveni rezultat moguće objasniti manjim brojem ispitanica u ovom istraživanju u odnosu na broj ispitanica u epidemiološkim studijama (50). Nepostojanje statistički značajne razlike u gestacijskoj dobi govori za dobro usklađene posteljice prema trajanju trudnoće pa tako i prema izlučivanju citokina čije se lučenje mijenja s trajanjem trudnoće. Pretilost se često navodi kao rizični čimbenik za PE, što potvrđuju rezultati i ovog istraživanja gdje nalazimo statistički značajno veći indeks tjelesne mase u trudnica s PE u odnosu na trudnice s HELLP sindromom i trudnice iz kontrolne skupine (51). Statistički značajno veće vrijednosti sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka u skupini ispitanica s PE u odnosu na ispitanice s HELLP sindromom u skladu su s činjenicom da u 15% slučajeva HELLP sindroma ne postoji popratna hipertenzija ni proteinurija. Statistički značajno više novorođenčadi sa zastojem rasta u skupini trudnica s PE i HELLP sindromom dodatno potvrđuje dobro odabrane skupine ispitanica (52).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako nije bilo očekivane razlike u izražaju upalnih citokina TNF-α, IL-6 i IL-10 u viloznom TB-u resica, SČ-ima i decidui bazalis između posteljica trudnoća s PE, HELLP sindromom i kontrolnih posteljica. Najveći izražaj upalnih citokina TNF-α, IL-6 i IL-10 bio je u stanicama decidue bazalis, potom nešto slabiji u SČ-ima, a najslabiji izražaj upalnih citokina imale su stanice viloznog TB-a u sve tri skupine

ispitivanih posteljica. Dosadašnja istraživanja uglavnom su izražaj upalnih citokina pručavala samo na stanicama TB-a, rijetko na stanicama decidue, a ovo je prvo istraživanje do sada koje je ispitalo izražaj upalnih citokina u SČ-ima (34). Prema našim spoznajama, ovo je ujedno i prvo istraživanje koje je istovremeno izučavalo izražaj upalnih citokina u različitim segmentima posteljice i prvo istraživanje koje je pri tom jasno razdvojilo posteljice s PE od posteljica s HELLP sindromom prema strogo definiranim kriterijima uključenja.

Uredna trudnoća je stanje kontroliranog sistemskog upalnog odgovora majke, a u trudnoći s PE i HELLP sindromom nalazimo postojanje donekle naglašenije upalne reakcije, a brojna istraživanja ukazuju na porast proupalnih citokina u serumu kao i u posteljicama tudnoća s PE (53, 54). TNF-α je proupalni citokin koji ima snažan utjecaj na funkciju trombocita, na koagulacijski sustav, vazokonstrikciju i na sam endotel krvnih žila. Rinehart i suradnici pokazali su povećan izražaj IL-10, IL-β i TNF-α u posteljicama s PE u odnosu na posteljice urednih terminskih trudnoća (55). Međutim, drugi autori izvještavaju kako nema razlike u izražaju TNF-α u posteljicama s PE u odnosu na posteljice urednih trudnoća sugerirajući neke druge izvore porasta proupalnih citokina u krvi majke (56). Rezultati ovog istraživanja u skladu su s rezultatima Benyo i suradnika koji su pokazali kako nema razlike između izražaja TNF-α, IL1-α, IL-1β i IL-6 između posteljica s PE i posteljica iz urednih trudnoća. Kako bi istražili posteljicu kao mogući izvor povišenih citokina, oni su za vrijeme carskog reza određivali citokine u perifernoj krvi trudnica i venskoj krvi iz maternice u trudnica s PE i u urednim trudnoćama. Pokazali su povišene vrijednosti upalnih citokina u perifernoj cirkulaciji, a izmjerene vrijednosti citokina u venskoj krvi maternice isključile su posteljicu kao mogući izvor povišenih citokina u cirkulaciji (40).

IL-6 je multifunkcionalni upalni citokin koji regulira imunološki odgovor akutne faze i ima središnju ulogu u imunološkoj obrambenoj reakciji. Dosadašnja istraživanja o IL-6 ukazuju na povišen, nepromjenjen ili čak snižen izražaj IL-6 u posteljicama s PE u odnosu na kontrolne posteljice (57). Luppi i suradnici pokazali su kako je sinteza proupalnih citokina IL-1α i IL-6 u monocitima žena s PE znatno veća nego u žena s urednom trudnoćom ili žena koje nisu trudne (58). Istraživanje Lockwooda i suradnika pokazalo je pojačan izražaj IL-6 u decidui posteljica žena s PE u odnosu na kontrolne, gestacijski usklađene trudnoće (39). Brojna istraživanja upućuju na povišene vrijednosti IL-6 u serumu trudnica s PE dok su Tosun i suradnici pokazali kako teže oblike PE prate veće vrijednosti IL-6 i TNF-α u serumu oboljelih trudnica (53, 54).

IL-10 je protuupalni citokin koji inhibira sintezu proupalnih citokina u makrofazima, NK stanicama i T limfocitima. Uredne, nekomplicirane trudnoće imaju znatno veće vrijednosti protuupalnih citokina nego trudnoće s PE. Smanjen izražaj IL-10 u serumu, ali i u TB-u posteljica s PE u odnosu na uredne trudnoće u svom istraživanju pokazao je Hennessy sa suradnicima (41). Nekoliko studija navodi porast vrijednosti IL-10 u serumu i u TB-u posteljica s PE, što se objašnjava kao kompenzatorni odgovor na prethodni porast proupalnih citokina (59, 60).

Postoji svega nekoliko istraživanja o citokinima u HELLP sindromu. Haeger i suradnici su u 11 trudnica s HELLP sindomom i 11 urednih, terminskih trudnoća određivali vrijednosti TNF-α i IL-6 u plazmi i nisu našli razliku u vrijednosti citokina između ispitivanih skupina (61). Imunohistokemijski obojeni uzorci jetre bolesnica umrlih zbog HELLP sindroma pokazali su intenzivnu obojenost na TNF-α, pa se TNF-α ističe kao uzrok opsežnih oštećenja u sklopu HELLP sindroma (62). Tranquilli i suradnici su istražili izražaj 14 upalnih citokina u posteljicama trudnoća s HELLP sindromom u usporedbi s posteljicama urednih, terminskih trudnoća i pokazali povišen izražaj IL-10, IL-6 receptora i TGF-β (42).

Glavni značaj našeg proučavanja razine upalnih citokina u stanicama posteljice je: u analizi izražaja citokina u različitim segmentima posteljice (viloznom TB-u, SČ-ima i decidui bazalis), u broju ispitanih posteljica, usklađenosti ispitivanih posteljica prema prema trajanju trudnoće s kontrolnim posteljicama, korištenju semikvantitativne HSCORE metode i preciznim kriterijima uključenja (i isključenja) ispitanica - posteljica u studiju. Većina studija analizirala je samo TB, samo deciduu ili cijelo posteljično tkivo. Nejasni i nedovoljno definirani kriteriji za dijagnostiku PE i HELLP sindroma, uspoređivanje ispitivanih posteljica najčešće s posteljicama urednih terminskih trudnoća česta je pogreška te različitost tehnika za otkrivanje izražaja citokina mogu objasniti postojeću različitost podataka u literaturi kada je riječ o izražaju citokina u posteljicama s PE i HELLP sindromom. Naime, vrlo dobro je poznato da se lučenje citokina u posteljici znatno mijenja ovisno o trajanju gestacije. Budući da smo sve navedeno dobro definirali, a posteljice uskladili prema trajanju trudnoće, na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da posteljica nije izvor povišenih vrijednosti ispitivanih upalnih citokina u krvi trudnica oboljelih od PE ili HELLP sindroma kao što se nagađalo u prijašnjim istraživanjima. Izvor upalnih citokina dakle treba tražiti u samom majčinom organizmu. Simptomi PE i HELLP sindroma naočigled su heterogeni, ali se svi mogu objasniti generaliziranim oštećenjem endotela, što se uklapa u teoriju pretjerane imunološke upalne reakcije majke u trudnoćama s PE i HELLP sindromom. Posteljica, ili

neki čimbenik koji posteljica otpušta u cirkulaciju krivac je generalizirane upalne reakcije majke i povećanog stvaranja upalnih citokina u organizmu trudnica oboljelih od PE i HELLP sindroma. Taj čimbenik dovodi do aktivacije endotela krvnih žila majke i aktivacije polimorfonuklearnih leukocita i drugih upalnih stanica s posljedičnim pojačanim stvaranjem upalnih citokina. Svi simptomi PE i HELLP sindroma mogu se protumačiti upravo serumskim porastom proupalnih citokina: i hipertenzija i proteinurija i prateći poremećaji koagulacije. Na temelju dobivenih rezultata zaključili smo kako taj „toksični" čimbenik iz posteljice najvjerojatnije nisu ispitivani upalni citokini, s obzirom na to da nismo pronašli razliku u izražaju citokina u analiziranim segmentima posteljica iz trudnoća s PE i HELLP sindromom u odnosu na kontrolne posteljice. Nadalje, analizirajući zasebno izražaj u viloznom TB-u, SČ-ima i decidui bazalis otkrili smo kako su upravo decidualne stanice imale najveći izražaj upalnih citokina, no nije pronađena razlika između ispitivanih skupina što isključuje deciduu kao izvor povišenih upalnih citokina u cirkulaciji oboljelih, ali istodobno ističe kao mjesto značajne sinteze upalnih citokina. U dosadašnjim istraživanjima izražaja upalnih citokina u posteljicama decidua bazalis je zanemarivana kao mogući izvor citokina, a najčešće su analizirane samo stanice viloznog TB-a.

Posljednjih godina uočena je pojačana apoptotska aktivnost TB-a posteljica trudnoća s PE i HELLP sindromom (63, 64). Apoptotska aktivnost najmanje je izražena u stanicama CTB-a, potom raste u STB-u i najizraženija je u SČ-ima (31). Rezultati ovog istraživanja potvrdili su veću apoptotsku aktivnost CTB-a, STB-a i SČ-a posteljica s PE (AI CTB=2,19±1,03, AI STB=3,76±2,62, AI SČ=5,89±2,5) te još izraženiju apoptozu CTB-a, STB-a i SČ-a posteljica s HELLP sindromom (AI CTB=2,82±1,77, AI STB=4,10±2,26 , AI SČ=10,79±4,57) u odnosu na apoptozu CTB-a, STB-a i SČ-a kontrolnih posteljica (AI CTB=0,98±0,38, AI STB=1,39±0,57, AI SČ=3,3±1,1). U ovom istraživanju se je po prvi puta proučavalo apoptozu u decidui te ukazalo na pojačanu apoptotsku aktivnost i u „maternalnom dijelu" posteljice (AI decidue =17,41±9,81) u trudnoćama s PE i u trudnoćama s HELLP sindromom (AI decidue=28,46±8,5) u odnosu na kontrolne posteljice (AI decidue=8,69±4,92). Apoptoza decidue proučavana je samo na posteljicama prvog tromjesječja pa je ovo prvo istraživanje koje je analiziralo i dokazalo postojanje pojačane apoptotoze i u decidui posteljica s PE i HELLP sindromom (65). Apoptoza TB-a u ovim bolestima trudnoće nije samo ubrzana, nego i poremećena, pa se u literaturi naziva aponekrozom. Patološku apoptozu, aponekrozu prvi put je opisao Formigli na fibroblastima štakora 2000. godine (32). U fizološkim uvjetima, u urednoj trudnoći SČ-i nastali „normalnom" apoptozom otpuštaju se u intervilozni prostor, tj.

u majčinu cirkulaciju i potom potpuno nestaju fagocitozom u plućnim makrofazima ne izazivajući nikakav upalni odgovor majčinog organizma. U patološkim uvjetima oslobađa se veći broj SČ-a, SČ-i nepravilne građe i fragmenti SČ-a koji prolaze barijeru plućnih makrofaga i nisu inertni prema imunološkom sustavu majke, nego izazivaju sistemski upalni odgovor majke karakterističan za PE i HELLP sindrom (66). SČ-i u *in vitro* uvjetima u monocitima dobivenim iz krvi žena koje nisu trudne, stimuliraju izlučivanje proupalnih citokina TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 i IL-18 (67). Nadalje, SČ-i u *in vitro* uvjetima izazivaju pucanje veza endotelnih stanica krvnih žila, a upravo taj fenomen napokon povezuje sve poznate činjenice o PE i HELLP sindromu: poremećenu apoptozu, veći ukupan broj SČ-a u cirkulaciji i veći broj nepravilnih SČ-a te kliničku simptomatologiju PE i HELLP sindroma (68).

Međuodnos proapoptotskih i antiapoptotskih čimbenika ključan je u regulaciji apoptoze, a njihova ekspresija u TB-u je predmet brojnih istraživanja (23). U nekoliko objavljenih studija kao mogući pokretač ubrzane apoptoze navode se citokini. Naime, poznato je da neki citokini imaju proapoptotski ili antiapoptotski učinak. Proapoptotski učinak TNF-α i IL-6 citokina na kulturama stanica prvog tromjesječja pokazali su Chen i suradnici. Oni su izlagali tkivo posteljica navedenim citokinima u *in vitro* uvjetima i pokazali povećanje apoptoze za 50% nakon izlaganju IL-6 i 23%-tno povećanje apoptoze nakon izlaganja TNF-α (69). U ovom istraživanju ispitana je povezanost izražaja proapoptotskih citokina TNF-α i IL-6 i antiapoptotskog citokina IL-10 s apoptozom u posteljicama s PE i HELLP sindromom. Statistički značajna pozitivna korelacija nađena je između izražaja TNF-α u TB-u posteljica s PE i apoptoze TB-a, dok se navedena korelacija gubi u posteljicama s HELLP sindromom i kontrolnim posteljicama. Također statistički značajna korelacija nađena je između izražaja TNF-α u SČ-ima posteljica s PE i apoptoze u SČ-ima, dok navedena korelacija ne postoji u posteljicama s HELLP sindromom i kontrolnim posteljicama. Na temelju ovih rezultata možemo zaključiti da je TNF-α jedan od čimbenika uključenih u ubrzanu i povećanu apoptozu posteljica s PE, dok u posteljicama s HELLP sindromom TNF-α nema znatnog utjecaja na apoptotske procese. Ovo istraživanje također je pokazalo statistički značajnu pozitivnu korelaciju između izražaja IL-10 u SČ-ima kontrolnih posteljica i apoptoze u SČ-ima. U urednim trudnoćama prevladava protuupalni citokin IL-10, dok se u patološkim trudnoćama gubi njegov protuupalni i antiapoptotski učinak što potvrđuje IL-10 kao jednog od kontrolora apoptoze u urednim trudnoćama. Naime, navedena korelacija gubi se u posteljicama s PE i HELLP sindomom. IL-10 je jedan od glavnih protuupalnih citokina u

normalnoj trudnoći, a očito i regulator fiziološke apoptoze. Naime, odavno je poznato kako u majčinom organizmu u trudnoći dolazi do imunosupresije i dominacije protuupalnih citokina kao načina sprečavanja odbacivanja stranog tkiva - fetusa. Manjkom protuupalnih (antiapoptotskih) citokina, a prevladavanjem proupalnih (proapoptotskih) citokina objašnjava se nastanak brojnih poremećaja trudnoće, primjerice ponavljanih spontanih pobačaja ali i nastanak PE i HELLP sindroma. Rezultati ovog istraživanja pokazali su statistički značajnu negativnu korelaciju izražaja IL-6 u decidui posteljica s HELLP sindromom i apoptoze decidue tih posteljica, što se može objasniti time da apoptozu decidue kontroliraju neki drugi čimbenici, a IL-6 ima suprotan učinak u maternalnom dijelu posteljice nego u TB-u kako su opisala dosadašnja istraživanja o učinku IL-6. Svakako, samu apoptozu decidue i izražaj drugih upalnih citokina u decidui posteljica te njihovu ulogu u nastanku PE i HELLP sindroma trebalo bi ispitati u budućim istraživanjima s obzirom na to da su zbivanja očito intenzivnija i izraženija u maternalnom dijelu posteljice.

Ovo istraživanje je pokazalo da se najveći broj SČ-a stvara u TB-u posteljica s HELLP sindromom, također značajno veći broj SČ-a stvara se u posteljicama s PE u odnosu na kontrolne posteljice (SČ HELLP=38,4±8,6, SČ PE=32,1±9,1, SČ KONTROLA=21,1±7,3). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da nije bilo statistički značajne razlike u broju resica između ispitivanih skupina, što jasno upućuje na to da povećan broj SČ-a nije rezultat manjeg broja resica u ispitivanim posteljicama, pa su i rezultati broja SČ-a izraženih po broju resica statistički značajno veći u posteljicama s HELLP sindromom u odnosu na posteljice s PE i kontrolne posteljice i u posteljicama s PE u odnosu na kontrolne posteljice. Ujedno, istraživanje je pokazalo povećan prosječan broj jezgara u SČ-ima posteljica s PE i HELLP sindromom. Do sada su samo dvije studije izvjestile o broju jezgara unutar SČ-a u posteljicama s PE (31, 70). Ovo je istraživanje prvi put izvjestilo o prosječnom broju jezgara u SČ-ima posteljica s HELLP sindromom i pokazalo kako je broj jezgara u SČ-ima posteljica s HELLP sindromom (broj jezgara u SČ=669,9±140,9) statistički značajno veći u odnosu na broj jezgara u SČ-ima posteljica s PE (broj jezgara u SČ=516,9±118,3) i statistički značajno veći u odnosu na broj jezgara u SČ-ima kontrolnih posteljica (broj jezgara u SČ=370,2±136,0). Ujedno, statistički značajno veći broj jezgara u SČ-ima je u posteljicama s PE u odnosu na kontrolne posteljice. Sve navedeno ostavlja mogućnost da se na temelju „teže" poremećene apoptoze u HELLP sindromu i evidentno većeg broja SČ-a koji dospijeva u majčinu cirkulaciju može objasniti i znatno teža klinička slika pacijentica s HELLP sindromom.

Prije 2400 godina Hipokrat je opisao poremećaj trudnoće karakteriziran glavoboljom, težinom i konvulzijama, no sve do danas unatoč brojnim istraživanjima i ranom otkrivanju ovih poremećaja, uzrok njihova nastanka je nepoznat, a liječenje je i dalje samo simptomatsko. U posljednja dva desetljeća intenzivno se proučava etiopatogeneza tih poremećaja te postoje brojne teorije njihova nastanka. Novija istraživanja upozoravaju na poremećenu apoptozu i oslobađanje toksičnog čimbenika iz posteljice trudnica oboljelih od PE i HELLP sindroma. Sve više istraživanja podupire tezu da su toksični čimbenik upravo SČ-i koji iz posteljice dospijevaju u majčinu cirkulaciju i pokreću upalna zbivanja u majčinu organizmu. Povišene razine upalnih citokina, prema rezultatima ovog istraživanja, ne nastaju u posteljici, nego su najvjerojatnije rezultat pojačne sinteze u stanicama majke (hepatociti, leukociti, endotel) kao odgovor na povećanu količinu „izmjenjenih" SČ-a s kojima te stanice dođu u kontakt.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su nove spoznaje o izražaju upalnih citokina u viloznom TB-u, SČ-ima i decidui bazalis posteljica s PE i HELLP sindromom. Naime, po prvi put je pokazano da je najveća sinteza upalnih citokina u majčinom dijelu posteljice tj. u decidui, manja u SČ-ima, a najmanja u TB-u u svim skupinama ispitivanih posteljica.

Istraživanje je potvrdilo povećanu apoptozu u posteljicama s HELLP sindromom u odnosu na posteljice iz PE i kontrole. To se očituje povećanom apoptozom u svim posteljičnim segmentima, povećanom broju jezgara i povećanom broju SČ-a, što možda pridonosi težoj kliničkoj slici i snažnijoj upalnoj reakciji u trudnica oboljelih od HELLP sindroma. Rezultati ovog istraživanja upozorili su i na poremećenu apoptozu decidue pa bi i taj fenomen trebalo proučiti u budućim studijama, kao i povezanost apoptoze s nekim drugim proupalnim ili protuupalnim citokinima koji, moguće je, reguliraju apoptotska zbivanja u posteljici.

Ovi rezulati isključili su posteljicu kao izvor upalnih citokina u serumu oboljelih i uputili nas na izvore citokina u majčinom organizmu. Upravo povećan broj SČ-a koji je pronađen u posteljicama oboljelih od PE, a još veći broj u posteljicama oboljelih od HELLP sindroma, može objasniti kliničku simptomatologiju tih poremećaja. Naime, na osnovu rezultata ovog istraživanja i dosadašnjih spoznaja o upalnim citokinima i apoptozi u PE i HELLP sindromu mogli bismo zaključiti da SČ-i nastali ubrzanom i nepravilnom apoptozom tzv. aponekrozom dospijevaju iz posteljice u majčinu cirkulaciju i potiču upalna zbivanja u majčinom organizmu u smislu aktivacije endotela krvnih žila majke i aktivacije upalnih stanica (leukocita) te poticanja povećanog stvaranja upalnih citokina, čijim se učincima mogu

objasniti svi prisutni simptomi trudnica oboljelih od PE i HELLP sindroma. Veći broj SČ-a koji je pronađen u posteljicama oboljelih od HELLP sindroma i njihov veći priljev u cirkulaciju očito izaziva i snažniji upalni odgovor koji objašnjava težu kliničku sliku oboljelih trudnica.

Ovo istraživanje je pokušalo dati odgovor o izražaju citokina u različitim segmentima posteljice i o mogućoj povezanosti s ubrzanom apoptozom. Dokazana je povezanost izražaja TNF-α i povećanog AI u TB-u i SČ-ima posteljica s PE pa je moguće kako je u tim posteljicama upravo ovaj citokin jedan od pokretača ubrzane apoptoze. U posteljicama s HELLP sindromom treba tragati za drugim mogućim medijatorima ubrzane apoptoze. IL-10 povezan je s apoptozom u posteljicama iz urednih trudnoća. Iako se PE i HELLP sindrom u mnogočemu poklapaju, moguće je da su različiti pokretači apoptoze razlog različitog stupnja poremećaja apoptoze i različitosti kliničke slike.

Buduća istraživanja trebaju tragati za drugim pokretačima ubrzane i poremećene apoptoze u posteljicama oboljelih od PE i HELLP sindroma, za mogućnošću njihove blokade i tako napokon ciljanom liječenju tih važnih poremećaja trudnoće koji dandanas odnose stotine tisuća života novorođenčadi i oboljelih trudnica.

6. ZAKLJUČCI

1. Apoptotska aktivnost u posteljicama s HELLP sindromom znatno je veća u odnosu na posteljice s PE i kontrolne posteljice, što se očituje povećanim apoptotskim indeksom viloznog TB-a, SČ-a i decidue bazalis. Apoptotska aktivnost u posteljicama s PE znatno je veća u odnosu na kontrolne posteljice. U svim ispitivanim skupinama apoptoza je najizraženija u decidui, pa u SČ-ima, pa u STB-u i najmanja u CTB-u.

2. Izražaj upalnih citokina TNF-α, IL-6 i IL-10 u viloznom TB-u, SČ-ima i decidui bazalis posteljica s PE i HELLP sindromom ne razlikuje se u odnosu na kontrolne posteljice. Najveći izražaj upalnih citokina TNF-α, IL-6 i IL-10 je u stanicama decidue, potom nešto slabiji u SČ-ima, a najslabiji u stanicama TB-a u sve tri skupine ispitivanih posteljica.

3. Izražaj TNF-α u TB-u i SČ-ima posteljica s PE u značajnoj je pozitivnoj korelaciji s apoptozom TB-a i SČ-a, dok u skupini s HELLP sindromom i u kontrolnoj skupini ta korelacija nije značajna. Izražaj IL-10 u SČ-ima kontrolne skupine u pozitivnoj je korelaciji s apoptozom SČ-a. Izražaj IL-6 u decidui posteljica s HELLP sindromom i apoptoze u decidui je u značajnoj negativnoj korelaciji.

4. Citomorfologija SČ-a različita je između ispitivanih skupina. Najveći broj čvorića i najveći broj njihovih jezgara je u posteljicama s HELLP sindromom.

7. SAŽETAK

Cilj: Istražiti izražaj upalnih citokina TNF-α, IL-6 i IL-10 u viloznom trofoblastu, sincicijalnim čvorićima i decidui te istražiti apoptozu svih segmenata viloznog trofoblasta i decidue posteljica trudnoća kompliciranih preeklampsijom i HELLP sindromom i rezultate međusobno usporediti. Istražiti povezanost izražaja upalnih citokina i apoptoze u ispitivanim skupinama posteljica. Istražiti citomorfološke karakteristike sincicijalnih čvorića ispitivanih posteljica.

Materijali i metode: Ispitivane skupine čine posteljice iz 35 jednoplodnih trudnoća kompliciranih preeklampsijom i 35 jednoplodnih trudnoća kompliciranih HELLP sindromom te isti broj kontrolnih trudnoća usklađenih s ispitivanim posteljicama prema trajanju trudnoće. Klinička dijagnoza preeklampsije postavljena je prema strogim kritetijima arterijske hipertenzije i proteinurije, a dijagnoza HELLP sindroma prema kriterijima za hemolizu, povišene jetrene enzime i trombocitopeniju. Izražaj upalnih citokina određivan je imunohistokemijski HSCORE metodom upotrebom specifičnih protutijela. Apoptotska aktivnost određena je uporabom protutijela M30. Od citomorfoloških karakteristika ispitivanih posteljica određivan je: broj resica, broj sincicijalnih čvorića i ukupan broj jezgara u samim čvorićima.

Rezultati: Nije pronađena statistički značajna razlika u izražaju upalnih citokina između posteljica s preeklampsijom, posteljica s HELLP sindromom i kontrolnih posteljica. Najveći izražaj upalnih citokina pronađen je u stanicama decidue, nešto slabiji u sincicijalnim čvorićima i najslabiji u viloznom trofoblastu u svim ispitivanim skupinama posteljica. Apoptotski indeks najizraženiji je u posteljicama s HELLP sindromom, nešto slabiji u posteljicama s preeklampsijom i najslabije izražen u kontrolnim posteljicama. Unutar pojedine skupine apoptoza je najizraženija u decidui, pa u sincicijalnim čvorićima, pa u sinciciotrofoblastu i najmanja u citotrofoblastu. Izražaj TNF-α u trofoblastu i sincicijalnim čvorićima posteljica s preeklampsijom u značajnoj je pozitivnoj korelaciji s apoptozom trofoblasta i sincicijalnih čvorića tih posteljica. Izražaj IL-10 u sincicijalnim čvorićima kontrolne skupine u pozitivnoj je korelaciji s apoptozom unutar sincicijalnih čvorića. Izražaj IL-6 u decidui posteljica s HELLP sindromom i apoptoze decidue tih posteljica u negativnoj je korelaciji. Najveći broj čvorića i najveći broj jezgra u sincicijalnim čvorićima pronađen je u posteljicama s HELLP sindromom.

Zaključak: Izražaj upalnih citokina ne razlikuje se između posteljica s preeklampsijom, HELLP sindromom i kontrolnih posteljica, što upućuje na druge izvore povišene razine upalnih citokina u krvi oboljelih trudnica. Najveći izražaj upalnih citokina pronađen je u stanicama decidue tj. u maternalnom dijelu posteljice, što upućuje na pojačan upalni odgovor majke u trudnoći. Teže poremećen apoptotski proces u posteljicama s HELLP sindromom objašnjava težu kliničku sliku tog poremećaja u odnosu na preeklampsiju. Najteže poremećen apoptotski proces nalazimo u stanicama decidue i sincicijalnim čvorićima posteljica. Upravo veći priljev sincicijalnih čvorića objašnjava i težu simptomatologiju oboljelih trudnica, dok doprinos pojačane apoptoze decidue u nastanku i težini bolesti do sada nije istraživan prema dostupnoj literaturi. Postojanje pozitivne korelacije TNF-α u trofoblastu i sincicijalnim čvorićima posteljica s preeklampsijom i apoptoze posteljica s preeklampsijom ističe moguću ulogu TNF-α u regulaciji apoptoze u preeklampsiji. Pozitivna korelacija IL-10 u sincicijalnim čvorićima kontrolnih posteljica i apoptoze u tim posteljicama ističe njegovu ulogu u fiziološkim uvjetima. Veći broj sincicijalnih čvorića i veći broj jezgara u sincicijalnim čvorićima posteljica s HELLP sindromom uz povećani AI doprinosi težoj kliničkoj slici oboljelih od HELLP sindroma.

8. SUMMARY

Inflammatory cytokines and apoptotic process in placentas from pregnancies complicated with preeclampsia and HELLP syndrome

Objective: To investigate the expression of inflammatory cytokines TNF-α, IL-6 and IL-10 in villous trophoblast, syncytial knots and decidua and to determine apoptosis in: villous trophoblast, decidua and syncytial knots in placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and HELLP syndrome and to compare the results with one another. To investigate the correlation of inflammatory cytokines and apoptosis in the studied placental groups and to investigate morphological characteristics of syntityal knots.

Material and methods: The study group consists of placentas from 35 singleton pregnancies complicated with preeclampsia and 35 singleton pregnancies complicated with HELLP syndrome, and the same number of gestational-age matched control pregnancies. Clinical diagnosis of preeclampsia was made according to the strict criteria of hypertension and proteinuria, and a diagnosis of HELLP syndrome according to the criteria of hemolysis, elevated liver enzymes and thrombocytopenia. Expression of inflammatory cytokines was determined immunohistochemically by HSCORE method using specific antibodies. Apoptotic activity was determined using the M30 antibody. Cytomorphological characteristics of examined placentas were determined by: the number of villi, the number of syncytial knots and the total number of nuclei in syncytial knots.

Results: There was not any significant difference in the expression of inflammatory cytokines between the preeclamptic placentas, placentas with HELLP syndrome and control placentas. The highest expression of inflammatory cytokines was found in decidual cells, weaker in syncytial knots and the weakest in villous trophoblast cells in all examined placental groups. Apoptotic activity is the highest in the placenta with HELLP syndrome, slightly lower in preeclamptic placentas and the least pronounced in the control placentas. Within the each placental group apoptosis was most pronounced in decidua, than in syncytial knots, than in syntytiotrophoblast and the lowest in cytotrophoblasts. TNF-α expression in trophoblast and syncytial knots placentas from preeclampsia shows the significant positive correlation with apoptosis of trophoblast and syncytial knots of placentas with preeclampsia. IL-10 expression in syncytial knots in control group placentas positivly correlated with apoptosis of syncytial knots. IL-6 expression in decidua placentas with HELLP syndrome is negatively correlated

with apoptosis in decidual cells. The largest number of syncytial knots and the largest number of nuclei in syncytial knots were found in placentas from HELLP syndrome.

Conclusion: Expression of inflammatory cytokines does not differ between placentas with preeclampsia, placentas with HELLP syndrome and control placentas suggesting other sources of inflammatory cytokines in the blood of pregnant women with preeclampsia or HELLP syndrome. The highest expression of inflammatory cytokines was found in decidual cells (maternal part of placenta) which suggest for enhanced maternal inflammatory response during pregnancy. Higher disrupted apoptotic process in placentas from HELLP syndrome explains the severe clinical signs of this pregnancy disorder in relation to preeclampsia. The highest disrupted apoptotic process was found in decidual cells and syncytial knots. Larger influx of syncytial knots explains severe symptomatology of patients with HELLP syndrome. Increased apoptosis in the decidua can contribute to the severity of the disease, although it has not been investigated according to the available literature.

There is a positive correlation of TNF-α in the trophoblast and syncytial knots placentas with preeclampsia and apoptosis in preeclamptic placentas that highlights the potential role of TNF-α in the regulation of apoptosis in preeclampsia. Positive correlation between IL-10 in syncytial knots of control placentas and apoptosis in these placentas emphasizes its role in physiological conditions. A larger number of syncytial knots and greater number of nuclei in the syncytial knots also contribute to more pronounced clinical symptoms of patients with HELLP syndrome.

9. LITERATURA

1. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. Lancet 2010;376:631-44.
2. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systemic review. Lancet 2006;367:1066-74.
3. ACOG Committee on Practice Bulletins-Obstetrics. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia, Number 33, January 2002. Obstet Gynecol 2002;99:159-67.
4. Weinstein L. Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1982;142:159-67.
5. Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review. BMC Pregnancy Childbirth 2009;9:8.
6. Sibai BM. Diagnosis, controversies, management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. Obstet Gynecol 2004;103:981-91.
7. Ilekis JV, Reddy UM, Roberts JM. Preeclampsia - a pressing problem: an executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development workshop. Reprod Sci 2007;14:508-23.
8. Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of the immune system in preeclampsia. Mol Aspects Med 2007;28:192-209.
9. Barton JR, Sibai BM. Diagnosis and management of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. Clin Perinatol 2004;31:807-33.
10. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excesive maternal inflammatory response to pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1999;180:499-506.
11. Roberts JM, Hubel CA. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. Placenta 2009;30:32-7.
12. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. Hypertension 2008;51:970-5.
13. Wen SW, Demissie K, Yang Q, Walker MC. Maternal morbidity and obstetric complications in triplet pregnancies and quadruplet and higher-order multiple pregnancies. Am J Obstet Gynecol 2004;191:254-8.
14. Sadler TW. Second week of development: Bilaminar germ disc. Ur: Sadler TW. Langman's medical embryology, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins 2010.

15. Benirschke K. Microscopic survey. Ur: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen NR. Pathology of the human placenta, Berlin, Springer 2006.
16. Kos M. Razvoj i građa posteljice. Ur: Kos M, Leniček T: Osnove patologije posteljice, Zagreb, Medicinska naklada 2011.
17. Fox H, Sebire NJ. Physiology of the placenta. Ur: Fox H : Pathology of the placenta, Philadelphia, Saunders 2007.
18. Baczyk D, Satkunaratnam A, Nait-Oumesmar B, Huppertz B, Cross JC, Kingdom JC. Complex patterns of GCM1 mRNA and protein in villous and extravillous trophoblast cells of the human placenta. Placenta 2004;25:553-9.
19. Huppertz B, Kingdom JC. Apoptosis in the trophoblast - role of apoptosis in placental morphogenesis. J Soc Gynecol Investig 2004;11:353-62.
20. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature 2000;407:770-6.
21. Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. Nat Med 2005;11:725-30.
22. Sharp AN, Heazell AE, Crocker IP, Mor G. Placental apoptosis in health and disease. Am J Reprod Immunol 2010;64:159-69.
23. Heazell AE, Crocker IP. Live and let die - regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies. Placenta 2008;29:772-83.
24. Kerr JF, Gobé GC, Winterford CM, Harmon BV. Anatomical methods in cell death. Methods Cell Biol 1995;46:1-27.
25. Pötgens AJ, Schmitz U, Bose P, Versmold A, Kaufmann P, Frank HG. Mechanisms of syncytial fusion: a review. Placenta 2002;23:107-13.
26. Castelluci M, Kaufmann P. Basic structure of the villous trees. Ur: Bernischke K, Kaufmann P, Baergen R. Pathology of the human placenta, New York, Springer Science Busines Media 2006.
27. Huppertz B. Placental villous trophoblast: the altered ballance between proliferation and apoptosis triggers pre-eclampsia. J Reproduktionsmed Endocrinol 2006;3:103-8.
28. Levy R, Nelson DM. To be, or not to be, that is the question. Apoptosis in human trophoblast. Placenta 2000;21:1-13.
29. Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JC. Apoptosis and its role in the trophoblast. Am J Obstet Gynecol 2006;195:29-39.
30. Leung DN, Smith SC, To KF, Sahota DS, Baker PN. Increased placental apoptosis in pregnancies complicated by preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 2001;184:1249-50.

31. Prusac IK, Zekic Tomas S, Roje D. Apoptosis, proliferation and Fas ligand expression in placental trophoblast from pregnancies complicated with HELLP syndrome or pre-eclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand 2011;90:1157-63.
32. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. J Cell Physiol 2000;182:41-9.
33. Bowen JM, Chamley L, Mitchell MD, Keelan JA. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women. Placenta 2002;23:239-56.
34. Keelan JA, Mitchell MD. Placental cytokines and preeclampsia. Front Biosci 2007;12:2706-27.
35. Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, Padbury J, Sharma S. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. J Immunol 2000;164:5721-8.
36. Li JQ, Qi HZ, He ZJ, Hu W, Si ZZ, Li YN, Li DB. Cytoprotective effects of human interleukin-10 gene transfer against necrosis and apoptosis induced by hepatic cold ischemia/reperfusion injuri. J Surg Res 2009;157:71-8.
37. Conrad KP, Miles TM, Benyo DF. Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia. Am J Reprod Immunol 1998;40:102-11.
38. Hung TH, Charnock-Jones DS, Skepper JN, Burton GJ. Secretion of tumor necrosis factor-alpha from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: a potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia. Am J Pathol 2004;164:1049-61.
39. Lockwood CJ,Yen CF, Basar M, Kayisli UA, Martel M, Buhimschi I, Buhimschi C, Huang SJ, Krikun G, Schatz F. Preeclampsia-related inflamatory cytokines regulate interleukin-6 expression in human decidual cells. Am J Pathol 2008;172:1571-9.
40. Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:2505-12.
41. Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. J Immunol 1999;163:3491-5.
42. Tranquilli AL, Landi B, Corradetti A, Giannubilo SR, Sartini D, Pozzi V, Emanuelli M. Inflammatory cytokines patterns in the placenta of pregnancies complicated by HELLP (hemolysis, elevated liver enzyme, and low platelet) syndrome. Cytokine 2007;40:82-8.

43. Aschenazi S, Straszewski S, Verwer KM, Foellmer H, Rutherford T, Mor G. Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. Biol Reprod 2002;66:1853-61.
44. Crocker IP, Barratt S, Kaur M, Baker PN. The in-vitro characterization of induced apoptosis in placental cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts. Placenta 2001;22:822-30.
45. Audibert F, Friedman SA, Frangieh AY, Sibai BM. Clinical utility of strict diagnostic criteria for the HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets) syndrome. Am J Obstet Gynecol 1996;175:460-4.
46. Kos M. Upale posteljice. U: Kos M, Leniček T: Osnove patologije posteljice, Medicinska naklada, Zagreb 2011.
47. Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. Placental apoptosis in preeclampsia. Obstet Gynecol 2000;96:271-6.
48. Chan CC, Lao TT, Cheung AN. Apoptotic and proliferative activities in first trimester placentae. Placenta 1999;20:223-7.
49. Ramma W, Ahmed A. Is inflammation the cause of pre-eclampsia? Biochem Soc Trans 2011;39:1619-27.
50. Robillard PY, Dekker G, Chaouat G, Hulsey TC, Saftlas A. Epidemiological studies on primipaternity and immunology in preeclampsia - a statement after twelve years of workshops. J Reprod Immunol 2011;89:104-17.
51. Frias AE, Grove KL. Obesity: a transgenerational problem linked to nutrition during pregnancy. Semin Reprod Med 2012;30:472-8.
52. Roberts DJ, Post MD. The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. J Clin Pathol 2008;61:1254-60.
53. Tosun M, Celik H, Avci B, Yavuz E, Alper T, Malatyalioğlu E. Maternal and umbilical serum levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preeclampsia. J Matern Fetal Neonatal Med 2010;23:880-6.
54. Jonsson Y, Rubèr M, Matthiessen L, Berg G, Nieminen K, Sharma S, Ernerudh J, Ekerfelt C. Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. J Reprod Immunol 2006;70:83-91.
55. Rinehart BK, Terrone DA, Lagoo-Deenadayalan S, Barber WH, Hale EA, Martin JN Jr, Bennett WA. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor alpha,

interleukin 1beta, and interleukin 10 is increased in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 1999;181:915-20.

56. Hayashi M, Ueda Y, Yamaguchi T, Sohma R, Shibazaki M, Ohkura T, Inaba N. Tumor necrosis factor-alpha in the placenta is not elevated in pre-eclamptic patients despite its elevation in peripheral blood. Am J Reprod Immunol 2005;53:113-9.
57. Al-Othman S, Omu AE, Diejomaoh FM, Al-Yatama M, Al-Qattan F. Differential levels of interleukin 6 in maternal and cord sera and placenta in women with pre-eclampsia. Gynecol Obstet Invest 2001;52:60-5.
58. Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. Clin Immunol 2006;118:268-75.
59. Benian A, Madazli R, Aksu F, Uzun H, Aydin S. Plasma and placental levels of interleukin-10, transforming growth factor-beta1, and epithelial-cadherin in preeclampsia. Obstet Gynecol 2002;100:327-31.
60. Xie C, Yao MZ, Liu JB, Xiong LK. A meta-analysis of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-10 in preeclampsia. Cytokine 2011;56:550-9.
61. Haeger M, Unander M, Andersson B, Tarkowski A, Arnestad JP, Bengtsson A. Increased release of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in women with syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. Acta Obstet Gynecol Scand 1996;75:695-701.
62. Halim A, Kanayama N, El Maradny E, Maehara K, Takahashi A, Nosaka K, Fukuo S, Amamiya A, Kobayashi T, Terao T. Immunohistological study in cases of HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets) and acute fatty liver of pregnancy. Gynecol Obstet Invest 1996;41:106-12.
63. Longtine MS, Chen B, Odibo AO, Zhong Y, Nelson DM. Villous trophoblast apoptosis is elevated and restricted to cytotrophoblasts in pregnancies complicated by preeclampsia, IUGR, or preeclampsia with IUGR. Placenta 2012;33:352-9.
64. Cecati M, Sartini D, Pozzi V, Giannubilo SR, Ferretti F, Stortoni P, Saccucci F, Tranquilli AL, Emanuelli M. Clues to apoptosis pathway involvement in hemolysis, elevated liver enzyme, and low platelet (HELLP) syndrome and intrauterine growth restriction (IUGR). J Matern Fetal Neonatal Med 2013;26:26-31.
65. Cinar O, Kara F, Can A. Potential role of decidual apoptosis in the pathogenesis of miscarriages. Gynecol Endocrinol 2012;28:382-5.
66. Redman CW, Sargent IL. Circulating microparticles in normal pregnancy and pre-eclampsia. Placenta 2008;29:73-7.

67. Messerli M, May K, Hansson SR, Schneider H, Holzgreve W, Hahn S, Rusterholz C. Feto-maternal interactions in pregnancies: placental microparticles activate peripheral blood monocytes. Placenta 2010;31:106-12.
68. Hoegh AM, Tannetta D, Sargent I, Borup R, Nielsen FC, Redman C, Sørensen S, Hviid TV. Effect of syncytiotrophoblast microvillous membrane treatment on gene expression in human umbilical vein endothelial cells. BJOG 2006;113:1270-9.
69. Chen LM, Liu B, Zhao HB, Stone P, Chen Q, Chamley L. IL-6, TNFalpha and TGFbeta promote nonapoptotic trophoblast deportation and subsequently causes endothelial cell activation. Placenta 2010;31:75-80.
70. Chua S, Wilkins T, Sargent I, Redman C. Trophoblast deportation in pre-eclamptic pregnancy. Br J Obstet Gynaecol 1991;98:973-9.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Jelena Marušić

Adresa: Klinika za ženske bolesti i porode, KBC Split
Spinčićeva 1, 21 000 Split
Tel 021 551-455; Mob 091 7818 967
E-mail: jelenamarusic@ymail.com

Rođena: 06.12.1972. u Splitu

Obrazovanje:

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu – Studij u Splitu (1997)

Specijalistički ispit iz ginekologije i porodništva – KBC Zagreb (2007)

Subspecijalizacija iz humane reprodukcije – KBC Zagreb (2013)

Zaposlenje:

Medicinski fakultet Split, Katedra za fiziologiju (1997-2001)

Klinika za ženske bolesti i porode, KBC Split (2001-)

Akademski stupnjevi i napredovanja:

Završen poslijediplomski doktorski studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu smjer **„**Klinička fiziologija**”**.

Znanstveno nastavno napredovanje:

Izbor u suradničko zvanje asistenta na Katedri za ginekologiju i porodništvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Nagrade:

Nagrada Medicinskog Fakulteta u Splitu 1998. godine za najboljeg studenta Medicinskog fakulteta u generaciji.

Sudjelovanje u nastavi:

Dodiplomska nastava - asistent na Katedri za ginekologiji i porodništvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu

Sudjelovanje na znanstveno – istraživačkom projektu:

Istraživač na projektu: „Antropometrija u perinatologiji" Broj projekta: 0176001 (2002. do 2004. godine); glavni istraživač: prof. dr. sc. Frane Mikulandra

Znanstveni novak na projektu: „Plućna embolija model suhog ronjenja" Broj projekta 108162 (1998-2001); glavni istraživač: prof. dr. sc. Željko Dujić

Publiciranje:

Autorstvo u knjigama:

1. Marko Jukić, Jelena Marušić. Kronična bol u zdjelici. U: Marko Jukić, Višnja Majerić Kogler i Mira Fingler. Bol - uzroci i liječenje. Medicinska naklada, Zagreb 2011.
2. Marušić J, Karelović D. Deskvamativni upalni vaginitis. U: Karelović D i sur. Infekcije u ginekologiji i perinatologiji, Medicinska naklada, Zagreb 2012.

Radovi objavljeni u CC indeksiranim časopisima:

1. Marusic J, Prusac IK, Tomas SZ, Karara JR, Roje D. Expression of inflammatory cytokines in placentas from pregnancies complicated with preeclampsia and HELLP syndrome. J Matern Fetal Neonatal 2012;26(7):680-5.
2. Strinic T, Roje D, Marusic J, Capkun V. Cord blood cortisol level is lower in growth-restricted newborns. J Obstet Gynaecology Res 2007;33:144-150.
3. Marijan Šitum, Zoran Đogaš, Zoran Vujnović, Marijan Erceg, Janoš Terzić, Jelena Marušić, Dinko Mirić. Increased Incidence of Colorectal Cancer in the Split-Dalmatia Country: Epidemiological Study. CMJ 2001;42:181-7.

Radovi objavljeni u non CC indeksiranim časopisima

1. Roje D, Tadin I, Bakotin Jakovac M, Vulić M, Meštrović Z, Marušić J. Insuficijencija cerviksa. Gynecol Perinatol 2010;19:1-6.

2. Jelena Marušić, Davor Eterović, Ivana Marinović-Terzić, Darija Baković, Željko Dujić. Dry diving as a human model of pulmonary microembolization. Medicinski glasnik Ljekarske komore Zeničko-dobojskog kantona 2009;6:42-52.
3. Pavlinac I, Marin A, Valic M, Marusic J, Roje D, Pecotic R, Tadin I, Djogas Z. Influence of the wars in Croatia and Bosnia and Herzegovina on the incidence and outcome of singleton premature births in the Split University Hospital. Central European Journal of Medicine 2008;3:187-93.
4. Roje D, Tadin I, Marušić J, Vulić M, Aračić N, Vučinović M, Branica D, Čerškov K, Đirlić M, Markovina D. Porodne težine i duljine novorođenčadi u Splitu. Opravdanost razvijanjanja vlastitih referentnih vrijednosti za ocjenjivanje fetalnog rasta. Gynaecol Perinatol 2005;14:66-74.
5. Tadin I, Roje D, Marušić J, Vučinović M, Vulić M, Aračić N. HELLP sindrom. Gynecol Perinatol 2004;13:7-12.

Sažeci objavljeni u CC indeksiranim časopisima:

1. Roje D, Kuzmic-Prusac I, Zekic-Tomas S, Marusic J, Vulic M, Capkun V. Asymmetric growth is not associated with altered trophoblast apoptotic activity in idiopathic intrauterine growth retardation. J Matern Fetal Neonatal Med 2012;25:81-2.
2. Roje D, Tadin I, Marusic J, Vulic M, Aracic N, Vucinovic M, Karelovic D. The Impact of Weight Gain in Pregnancy on Proportionality of Fetal Growth. Int J Gynaecol Obstet 2003;83:46.

Sažeci objavljeni u non CC indeksiranim časopisima:

1. Benzon S, Vulić M, Marušić J, Roje D, Kopić D, Zeljak M, Split: Primjena rekombinantnog aktiviranog čimbenika VII kod poslijeporođajnog krvarenja. Gynecol Perinatol 2010;19:126.
2. Roje D, Vulić M, Vuković S, Meštrović Z, Benzon Z, Marušić J, Maleš Z, Tadin I, Čulić V, Lozić B, Stipoljev F, Mužinić D, Brajenović Milić B, Kavelj M, Split-Zagreb-Rijeka: Prvih pet godina invazivne prenatalne dijagnostike kromosomopatija u Splitu. Gynecol Perinatol 2010;19:132.

3. Mikulandra F, Stoini E, Tadin I, Roje D, Miletić T, Vulić M, Marušić J. Antropometrijski parametri roditelja i njihove novorođenčadi u Splitsko-dalmatinskoj županiji. Gynaecol Perinatol 2004;13:141.
4. Tadin I, Roje D, Marušić J, Vučinović M, Vulić M, Aračić N. HELLP sindrom. Gynecol Perinatol 2004;13:7-12.
5. Roje D, Tadin I, Marušić J, Vulić M, Aračić N, Vučinović M, Karelović D. Utjecaj prirasta mase trudnice na proporcionalnost fetalnog rasta. Gynecol Perinatol 2004;13:144.
6. Karelović D, Tadin I, Strinic T, Vidović S, Vrdoljak E, Kosović I, Marušić J, Benzon S, Meštrović Z, Branica D. Rak endometrija u Klinici za ženske bolesti i porode KB Split. Gynaecol et Perinatol 2004;13:131.
7. Roje D, Marušić J, Tadin I, Branica D, Čerškov K, Đirlić M, Markovina D, Vulić M, Aračić N, Vučinović M. Porodne težine i duljine novorođenčadi u Splitu. Gynecol Perinatol 2004;13:171.

Strani jezici:

Engleski (aktivno); talijanski (pasivno).