# Imunohistokemijska razina EGF-a, EGFR-a i HIF-1α u posteljicama iz trudnoća kompliciranih preeklampsijom

**Kosović, Indira**

**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:171:913449

*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

**Indira Kosović**

# IMUNOHISTOKEMIJSKA RAZINA EGF-a, EGFR-a i HIF-1α U POSTELJICAMA IZ TRUDNOĆA KOMPLICIRANIH PREEKLAMPSIJOM

**Doktorska disertacija**

Split, 2022.

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

Mentor: doc. dr.sc. Sandra Zekić Tomaš

ZAHVALE

Hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Sandri Zekić Tomaš na nesebičnoj, profesionalnoj i prijateljskoj pomoći prilikom izrade disertacije. Hvala što je uložila svoju „mladenačku“ snagu i kreativnost te meni u pomalo „poznim“ profesionalnim godinama dala neograničeno povjerenje i vrijeme.

Hvala mojoj kolegici prof. dr. sc. Jeleni Marušić na korisnim savjetima prilikom izrade ovog rada te podršci koju mi je pružala kad bih posustajala.

Hvala mojoj obitelji na odgoju, ljubavi, težnji učenju i beskompromisnim načelima koja me vode u životu.

Hvala onima koji su najzaslužniji da ova disertacija uopće postoji. Hvala mojoj Miji, najstrožoj kritičarki i odličnoj lektorici čije su primjedbe i komentari poboljšali kvalitetu ovog rada.

Hvala mom Tediju, na svemu… Hvala što je vjerovao i kad je razum izgubio nadu da ću ovu pustolovinu privesti kraju.

Disertaciju posvećujem onima bez čije bezuvjetne ljubavi i podrške ne bih mogla živjeti.

Tediju i Miji koji su najbolje iskusili sve muke mog profesionalnog razvoja.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA……...1

1. UVOD……2

1.1 PREEKLAMPSIJA……...2

1.2 POSTELJICA……4

1.2.1 Razvoj, građa i funkcija posteljice…….....4

1.2.2 Fiziologija trofoblasta, apoptoza i oksidativni stres u urednoj trudnoći……7

1.2.3 Apoptoza, oksidativni stres trofoblasta u trudnoćama sa preeklampsijom……9

1.3 FAKTORI RASTA: EGF i EGFR……..12

1.4 HIPOKSIJOM INDUCIRAN FAKTOR 1α, HIF1-α…….....15

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE……18

3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA…….....19

3.1 MATERIJAL……..19

3.2 METODE ISRRAŽIVANJA……..20

3.2.1 Obrada i patohistološki pregled posteljice……...20

3.2.2 Imunohistokemijsko bojanje……....20

3.2.3 Statistički postupci……...23

4. REZULTATI……24

4.1 Demografska obilježja skupine……...24

4.2 Izražaj EFGR-a u decidualnim stanicama,viloznom i ekstraviloznom trofoblastu u posteljicama iz trudnoća kompliciranih preeklampsijom……25

4.3 Izražaj EGF-a u decidualnim stanicama, viloznom i ekstraviloznom trofoblastu u posteljicama iz trudnoća kompliciranih preeklampsijom……26

4.4 Proliferacijski indeks u decidualnim stanicama, ekstraviloznom trofoblastu posteljica iz

trudnoća kompliciranih preeklampsijom……..27

4.5 Izražaj HIF1-α u decidualnim stanicama, viloznom, ekstraviloznom trofoblastu u posteljicama iz trudnoća kompliciranih preeklampsijom…….28

5. RASPRAVA…….……29

6. ZAKLJUČCI…….36

7. SAŽETAK…….....37

8. SUMMARY……..39

9. LITERATURA……..41

10. ŽIVOTOPIS……47

**POPIS KRATICA**

**PE** – preeklampsija

**IUZR** – intrauterini zastoj rasta

**TB** – trofoblast

**CTB** – citotrofoblast

**STB** – sinciciotrofoblast

**SČ** – sincicijski čvorići

**DS** – decidualna stanica

**VTB** – resičasti trofoblast

**EVTB** – izvanresičasti trofoblast

**HIF-1α** – hipoksijom induciran faktor 1 alfa

**EGF** – epidermalni faktor rasta

**EGFR** – receptor za epidermalni faktor rasta

**OS** – oksidativni stres

**ROR** – slobodni kisikovi radikali

**IHK** – imunohistokemija

# 1. UVOD

## 1.1 PREEKLAMPSIJA

Preeklampsija (PE) je multisistemska bolest specifična za trudnoću s incidencijom 2 – 8% i vodeći je uzrok maternalnog i fetalnog mortaliteta i morbiditeta (1). Prema klasifikaciji ACOG-a (*The American Congress of Obstetricians and Gynecologists*), PE je jedan od oblika hipertenzivne bolesti u trudnoći. Kliničke značajke ove bolesti opisali su unatrag 2000 godina Hipokrat i Celsus. PE se definira kao novonastala hipertenzija (dijastolički tlak iznad 90 mm Hg, sistolički tlak iznad 140 mm Hg) združena sa proteinurijom (više od 300 mg u 24 h), koja nastaje nakon 20. tjedna trudnoće u prethodno normotenzivnih žena (2). Na osnovi vrijednosti povišenoga krvnog tlaka i proteinurije, prisutnosti kliničkih simptoma i zahvaćenosti drugih organskih sustava dijelimo je na blagu i tešku PE (3). Prema vremenu pojavljivanja, dijelimo je na ranu (prije 34. tjedna) i kasnu (nakon 34. tjedna). Rana PE najčešće se klasificira kao teška PE i obično je združena s intrauterinim zastojem u rastu (IUZR). Kasna PE predstavlja blažu kliničku sliku i ispoljava se najčešće kao majčin fenotip, što uključuje hipertenziju i proteinuriju (4). Jedan od oblika PE predstavlja HELLP sindrom (engl. *Haemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelet count syndrome*) čije su karakteristike hemoliza, povišene vrijednosti jetrenih enzima i trombocitopenija. Preeklampsija je bolest „mnogo teorija“, a po današnjim spoznajama predstavlja heterogenu skupinu entiteta (fenotipova), koja dijeli zajedničke značajke, ali pokazuje i važne razlike (5). Sve teorije uključuju hipoperfuziju posteljice kao pokretački mehanizam bolesti, a to potkrjepljuju i činjenice da je učestalost PE veća u stanjima hiperplacentacije, kao što su višeplodove trudnoće, gestacijska trofoblastična bolest i gestacijski dijabetes (6). Odstranjenjem posteljice dolazi do prestanka simptoma, s izuzetkom postpartalne preeklampsije koja nastaje zbog zaostalih dijelova trofoblasta u majčinoj krvi još neko vrijeme (7). Pravilan razvoj posteljice neophodan je za pravilan rast i razvoj embrija te uredan tijek trudnoće. Brojni imunološki, vaskularni, genetski i okolišni faktori mogu uzrokovati poremećaje u veoma ranom razvoju posteljice koji će naknadno voditi PE (8). Prema novim spoznajama razvoj PE zbiva se kroz 2 stadija: rani ili placentarni stadij, predstavlja poremećaj placentacije uslijed neadekvatne invazije trofoblasta te kasni ili sistemski stadij, koji predstavlja posljedičnu aktivaciju majčinog imunog odgovora na apoptotske mikrofragmente trofoblasta i vazoaktivne čimbenike u cirkulaciji, što vodi generaliziranom oštećenju endotela (9). Oksidativni stres predstavlja poveznicu između navedenih dvaju stadija. Posljednjih godina, zbog opsežnih istraživanja, dolazi do promjena u definiranju početka PE-e od sredine trudnoće pred razvoj kliničkih simptoma prema veoma ranim stadijima trudnoće.

Brojni novootkriveni serumski biljezi, čije se izmijenjene koncentracije uočavaju i ranije od 7. tjedna trudnoće, ukazuju na vrlo rani početak PE gotovo nakon implantacije, iako će se bolest manifestirati od sredine trudnoće (10, 11). Otkriće novih biomarkera, kao što su PP13, PTX3, PAPP-A, ukazuje na to da je preeklampsija sindrom rane placentacije. Oštećenja resičastog trofoblasta (VTB) produktima oksidativnog stresa vode izmijenjenome životnom ciklusu trofoblasta i imaju centralnu ulogu u aktivaciji majčinoga imunog odgovora (12). Poremećaji u životnom ciklusu resičastog trofoblasta (VTB-a) uključuju izmijenjenu proliferaciju citotrofoblasta (CTB-a), poremećenu diferencijaciju i fuziju citotrofoblasta u sinciciotrofoblast (STB) te pojačano otpuštanje fragmentiranih dijelova trofoblasta u cirkulaciju majke (10). Nove teorije kroz poremećaje u diferencijaciji unutar različitih puteva trofoblastnog razvoja jasno razdvajaju podrijetlo PE od IUZR-a (8, 9). Tijekom rane faze uredne trudnoće izvanresičasti trofoblast (EVTB) migrira u deciduu te invadira žlijezde decidue i spiralne arterije, dosežući do unutarnje trećine miometrija gdje se zbiva i najdublja invazija. Ovaj je proces neobičan, s obzirom na to da su posteljične stanice CTB-a hemi-alogene te odražavaju i majčin i očev genom. Invadirajući u krvne žile majke, mijenjaju nizvodno endotelnu liniju, ali i ulaze među glatke mišićne stanice krvnih žila izvana odlagajući fibrin (13). Spiralne arterije tako postaju široke krvne žile koje će osiguravati adekvatan dotok krvi u posteljicu kroz cijelu trudnoću. Izostankom fiziološke pretvorbe smanjuje se perfuzija posteljice, a spiralne arterije zadržavaju Borelovu ili „jet“ cirkulaciju obilježenu brzim, snažnim, ali uskim mlazom tijekom sistole i malim ili izostalim protokom kroz dijastolu. Brzina i snaga protoka oštećuje mehanički resice. Zbog održane vazokonstrikcije majčinih krvnih žila, u interviloznom prostoru izmjenjuju se razdoblja ishemije i reperfuzije, što vodi hipoksičnom oštećenju resica i pogoduje razvoju oksidativnog stresa. Oksidativno oštećenje posteljice, obilježeno generiranjem velike količine kisikovih slobodnih radikala (eng. *Reactive Oxygen Radicals* – ROR), vodi oštećenju endotela i sistemskoj vazokonstrikciji te aktivaciji mreže upalnih faktora i antiangiogenih faktora, uključujući aktivaciju leukocita, proteina akutne faze, izmijenjene koagulacijske kaskade, inzulinske rezistencije i hiperlipidemije. Sve navedene promjene viđaju se i u patološkim stanjima van trudnoće, kao što su dijabetes tipa 2 i debljina, pa je jasno da navedena preegzistentna stanja ubrzavaju razvoj PE (14). Tijekom trudnoće uz PE moguće su brojne i ozbiljne komplikacije poput cerebralnih napada, zatajenja bubrežne funkcije, pulmonalnog edema. PE je poveznica za razvoj kardiovaskularnih bolesti tijekom života. Nakon PE u trudnoći udvostručen je rizik za kardiovaskularne bolesti, a u slučajevima pojave ranog PE rizik raste za 8 do 9 puta. Najnovije studije ukazuju na trajno izmijenjenu vaskularnu reaktivnost nakon izloženosti endotela tijekom trudnoće antiangiogenim čimbenicima (15). Pacijentice

koje su u trudnoći imale PE u većem su riziku i za razvoj dijabetesa, čak i u odsutnosti gestacijskog dijabetesa, zbog prolongirane kronične upale koja je rizik za autoimune bolesti. Oštećenje endotela antiangiogenim čimbenicima, poput topljivog fms-kinaza tirozin 1 proteina (s-Flt-1) u PE, mogući je mehanizam i za oštećenu funkciju štitnjače (16). Trudnoće kompliciranе ranom PE u 30 % slučajeva rezultiraju rođenjem djece s IUZR-u koja će u kasnijem tijeku života imati veću učestalost arterijske hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa (17). Rizik za razvoj PE u trudnoći veći je kod prvorodilja, naročito mlađih od 20 i starijih od 35 godina života kao i kod žena koje su u prethodnim trudnoćama imale PE. U prilog genetskoj i imunološkoj podlozi razvoja PE idu i činjenice o većoj pojavnosti PE nakon postupaka umjetne oplodnje, kao i kod supruga muškaraca čije su prijašnje partnerice imale PE (18). Incidencija PE u porastu je naročito u razvijenim zemljama, što se pripisuje porastu predisponirajućih bolesti poput kronične hipertenzije, dijabetesa, debljine, ali i odgađanja trudnoće u kasniju generativnu dob (19).

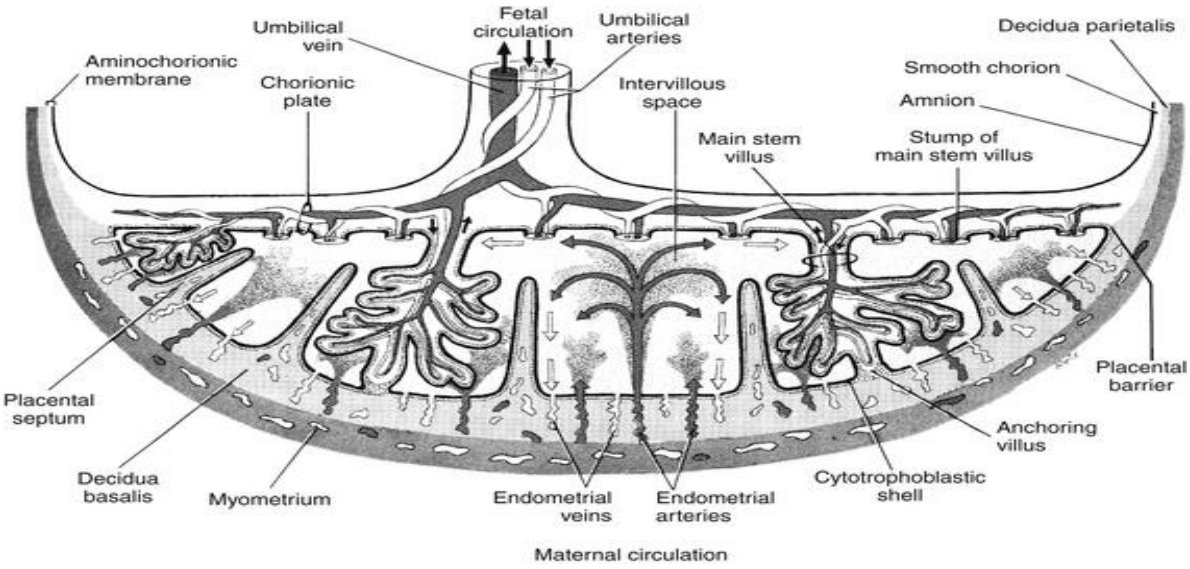
## 1.2 POSTELJICA

### 1.2.1 Razvoj, građa i funkcija posteljice

Posteljica, placenta ili plodva (lat. *placenta*: kolač, od grč. *plakuos*: ravan kolač) privremeni je endokrini organ koji nastaje isključivo u trudnoći, sjedinjenjem tkiva majke i tkiva zametka u morfološku i funkcionalnu cjelinu (19). Jedini je čovjekov organ koji se po završenoj funkciji jednostavno odbacuje. Razvoj posteljice započinje implantacijom blastociste u kojoj su se diferencirale dvije vrste stanica: vanjski sloj – trofoblast, i unutarnji sloj – embrioblast. Stanice embrioblasta pluripotentne su i diferenciraju se u različite vrste embrionalnih tkiva, dok su stanice trofoblasta epitelnog karaktera i brzo proliferiraju te se diferenciraju u dva sloja: sinciciotrofoblast, vanjski multinuklearni sloj, i citotrofoblast, unutrašnji mononuklearni sloj (20). Sinciciotrofoblast je tijekom trudnoće odgovoran za funkcionalnu aktivnost posteljice. Citotrofoblast predstavlja matične stanice i zadržava izrazitu proliferacijsku sposobnost, sudjeluje u izgradnji plutajućih i usidrenih resica te u intersticijskoj i endovaskularnoj invaziji strome endometrija kao izvanresični ili ekstravilozni (EVTB) trofoblast. Za razvoj posteljice i fetalnih membrana važno je pravovremeno aktiviranje gena na očevim kromosomima. Uspješna placentacija ovisi o međudjelovanju fetalnog trofoblasta i majčine decidualno izmijenjene sluznice, imunih, vaskularnih stanica te brojnih faktora rasta i transkripcijskih faktora koji autokrino i parakrino potiču stanice na daljnji rast (21). Posteljično tkivo neophodno je za

nastanak i održavanje uspješne trudnoće, dakle „života“ stoga je i paradoksalno da dijeli mnogo sličnosti s tumorskim tkivom. Uz zajednički izraženu sposobnost proliferacije, invadiranja podležećeg tkiva – decidue, stvaranja vlastitog krvotoka, kao i izbjegavanja imunog odgovora domaćina, zajednička je karakteristika i hipoksija u vrijeme početnog razvoja. Poznato je da se posteljica u prvom trimestru trudnoće razvija u uvjetima niskog tlaka kisika, koji je niži od 20 mm Hg. Hipoksija potiče proliferaciju EVTB-a i štiti embrij od oksidativnog stresa. Vremenski i prostorno strogo reguliran rast posteljice, nasuprot nepravilnom i kaotičnom rastu tumora, predstavlja najvažniju razliku između dvaju navedenih tkiva (22). Posteljica služi izmjeni hranjivih tvari i plinova između krvi majke i zametka, ima metaboličku, respiratornu, endokrinološku i imunološku funkciju (23). Na terminskoj posteljici razlikujemo fetalni dio ili korionsku ploču te majčin dio ili bazalnu ploču. Fetalni dio posteljice (lat. *placenta fetalis*) izgrađuje korionska ploča (amnij srastao s resičastim dijelom koriona) na kojoj se nalazi i mjesto insercije pupkovine te korionske resice koje se granaju u sve manje ogranke. Resice koje se distalnim dijelom pričvrste na bazalnu membranu usidrene su ili prirasle resice, a s njihovih lateralnih strana pupaju novi izdanci, tzv. slobodne resice. Stablo posteljičnih resica nastaje grananjem matičnih resica, koje ga povezuju s korionskom pločom osiguravajući mu mehaničku potporu. Unutar posteljičnog stabla razlikujemo mezenhimalne resice, zrele i nezrele intermedijalne resice i terminalne resice (24). Terminalne resice predstavljaju temeljnu funkcionalnu jedinicu posteljice, glavno su mjesto izmjene hranjivih tvari i kisika između majke i ploda u trećem tromjesječju trudnoće te sačinjavaju 50 % volumena posteljičnog stabla. Svaka resica građena je od strome i pokrovnog epitela. Epitel resice predstavlja trofoblast koji se sastoji od unutrašnjeg sloja ili citotrofoblasta (CTB-a) te vanjskog sloja ili sinciciotrofoblasta (STB-a). Stroma resice sadrži fibroblaste, ogranke fetalnih krvnih žila i resičaste makrofage ili Hofbauerove stanice. Na vrhovima terminalnih resica nalaze se sincicijski čvoriči (SČ) građeni od više jezgara unutar jedinstvene citoplazme, koji se postupno otpuštaju u majčinu cirkulaciju i koje uklanjaju plućni makrofagi. Površina resica zrele posteljice iznosi 15 $m^2$. Krajem trudnoće u tercijalnim resicama nedostaje citotrofoblast, a fetalne dilatirane kapilare utiskuju se u sinciciotrofoblast, tvoreći polupropusnu vaskulosincicijsku membranu kroz koju se izmjenjuju kisik i hranjive tvari između majke i fetusa. Majčin dio posteljice (lat. *placenta materna*) čine bazalna ploča ili decidua kroz koju prolaze uteroplacentne arterije i vene, placentni pretinci (lat. *septa placentae*), koji odlaze od bazalne ploče i nepotpuno odjeljuju 15 – 40 režnjeva (kotiledona) te stanice ekstraviloznog trofoblasta (EVTB-a) (24). Posteljica predstavlja hemo-korijalno-endotelnu pregradu između majke i ploda, zauzima 30 % unutarnje površine maternice i sa stanjenim rubovima prelazi u vodenjak (25). Pred kraj trudnoće

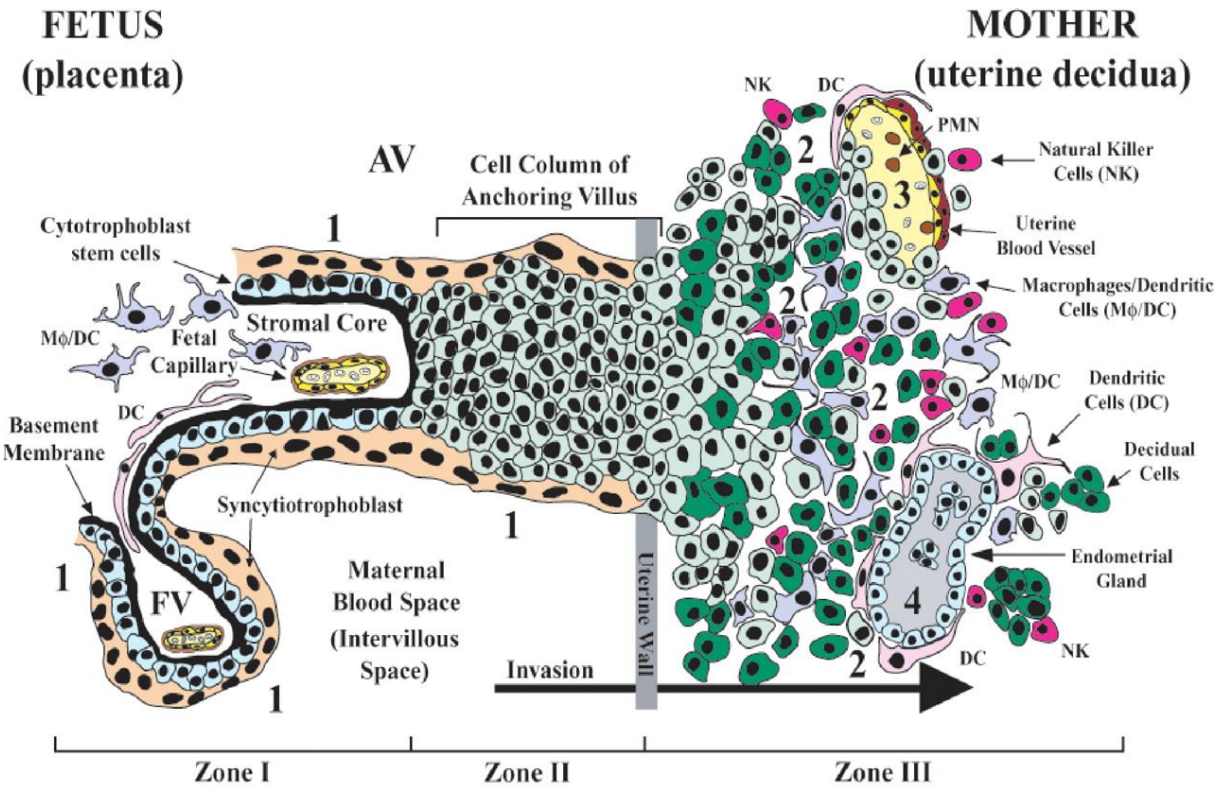
diskoidnog je oblika, promjera 15 – 20 cm, debljine 3 – 5 cm, mase 500 – 600 grama. Krvotok u posteljici dvojak je: fetalni optok krvi čine ogranci pupčanih (umbilikalnih) krvnih žila koje u najmanjim resicama završavaju mrežom kapilara. Ogranci umbilikalnih arterija dovode iz fetusa u posteljicu vensku krv, a ogranci pupčane vene odvode iz posteljice u fetus atrerijsku (oksigeniziranu) krv. Majčin ili uteroplacentni krvotok sastoji se od krvi koja iz 80 – 100 spiralnih arterija ulazi u intervilozni prostor, oplakujući površinu korionskih resica (Slika 1). Pred kraj trudnoće kroz korionske resice protječe oko 400 ml fetalne krvi, a kroz intervilozne prostore 500 – 600 ml majčine krvi. Proces razvoja posteljice možemo podijeliti na: 1) stvaranje i implantaciju blastociste, 2) diferencijaciju trofoblasta, 3) razvoj korionskih resica, 4) invaziju trofoblasta u krvne žile endometrija, 5) placentnu vaskulogenezu i angiogenezu.




Slika 1. Shematski prikaz građe posteljice. Preuzeto iz *Moore SP, Newberry DM, Jnah AJ. Use of Placental/Umbilical Blood Sampling for Neonatal Admission Blood Cultures: Benefits, Challenges, and Strategies for Implementation. Neonatal Netw. 2017 May 1;36(3):152-159.*

### 1.2.2 Fiziologija trofoblasta, apoptoza i oksidativni stres u urednoj trudnoći

Trofoblast predstavlja prvu staničnu liniju nakon oplodnje, koja se diferencira tijekom razvoja iz morule u blastocistu. Trofoblast je epitelni pokrov kompletne fetalne strane posteljice, dakle, svih terminalnih resica. Oko 7. dana nakon oplodnje blastocista se procesom apozicije veže uz decidualno izmijenjen endometrij, i to embrionalnim polom. Tijekom sljedećih nekoliko dana započinje proliferacija trofoblasta pri čemu nastaju dva sloja: vanjski – multinuklearni sinciciotrofoblast (STB) koji je u direktnom dodiru s majčinom krvi, i podležeći mu, unutarnji – mononuklearni sloj cititrofoblast (CTB) (26). Četrnaest dana nakon oplodnje posebna populacija stanica citotrofoblasta u sidrenim resicama poprima invazivne osobine, prodire kroz bazalnu membranu resica i invadira uterinu stromu, formirajući tzv. izvanresičasti trofoblast (EVTB). Ovaj trofoblast mijenja fenotip iz proliferacijskog u invazivni mijenjajući izražaj adhezijskih molekula, dolazi u kontakt s majčinim imunim stanicama, invadira uterine endometrijske žlijezde, vene i konačno ulazi u vrhove spiralnih arterija kao endovaskularni trofoblast u kojima formira rahle nakupine ili „čepove“ (Slika 2).




Slika 2. Shematski prikaz sidrene resice. Preuzeto iz *Yamamoto-Tabata T, McDonagh S, Chang HT, Fisher S, Pereira L. Human cytomegalovirus interleukin-10 downregulates metalloproteinase activity and impairs endothelial cell migration and placental cytotrophoblast invasiveness in vitro. J Virol. 2004 Mar;78(6):2831-40.*

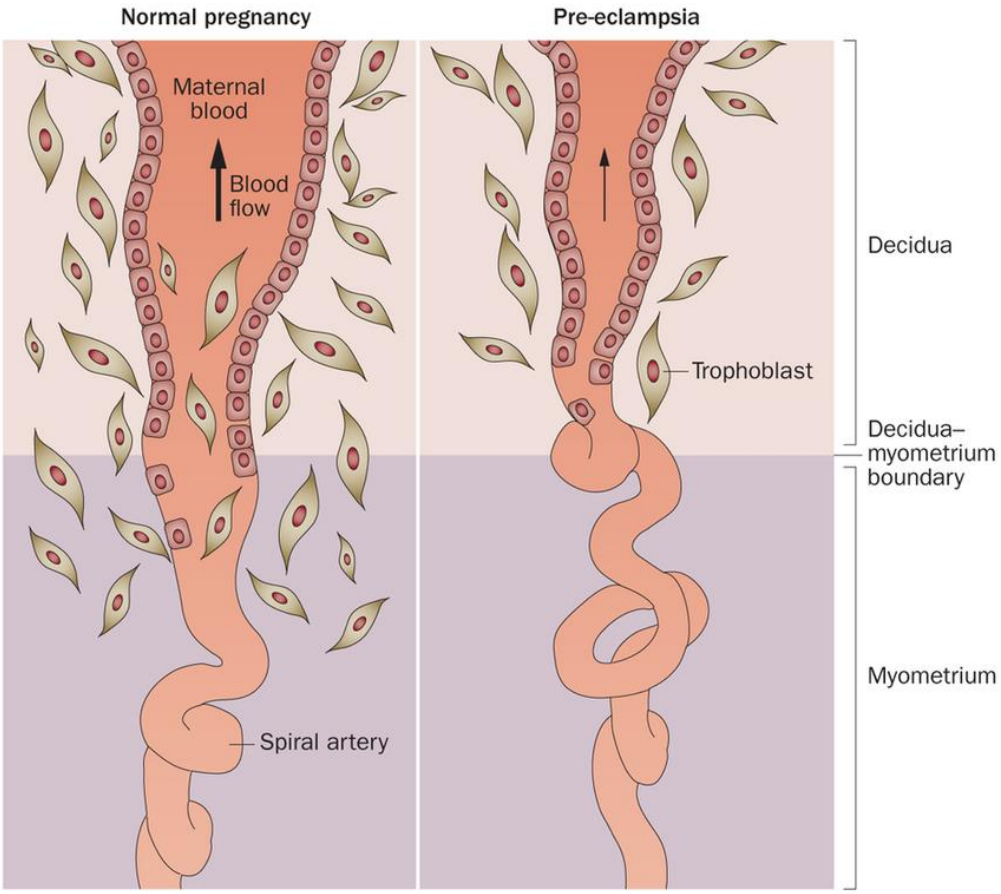
Funkcija je „čepova“ sprječavanje prijevremenog naglog dotoka majčine krvi u intervilozni prostor. Postupni i blagi porast tlaka kisika omogućava i postupni razvoj antioksidacijskog sustava obrane. Pojava majčine krvi u interviloznom prostoru počinje na perifernim dijelovima posteljice, gdje zbog nezrelosti resice atrofiraju i formira se glatki korion. Krv s periferije potom oplakuje centralne dijelove, što dozvoljava razvoj enzimatskog i neenzimatskoga obrambenog antioksidacijskog sustava resica u centralnom dijelu posteljice. Kada koncentracija kisika poraste tri puta u odnosu na početne vrijednosti, dolazi do kulminacije oksidativnog stresa, što korelira s vremenom najjače invazije trofoblasta u miometrijske dijelove spiralnih arterija početkom drugog trimestra trudnoće. Trudnoća na molekularnoj razini predstavlja metabolički izazov kako za majku tako i za plod u razvoju, praćena je visokim energetskim zahtjevima, visokom mitohondrijskom aktivnošću i sve većim potrebama za kisikom. Intrauterini oksidativni stres (OS) tijekom trudnoće predstavlja fiziološki stanični odgovor na povišene energetske zahtjeve rastućeg fetusa i posteljice. Kisikovi slobodni radikali (ROR) nastaju kao

produkt aerobnih metaboličkih procesa i u malim količinama važan su signalni produkt za tijek uredne placentacije i očuvane mitohondrijske aktivnosti. Enzimatski obrambeni sustav, koji čine superoksid-dismutaza, katalaza i glutation-peroksidaza, predstavlja prvu liniju obrane od ROR-a, a vitamini C, E, β-karoten čine drugu liniju obrane i inaktiviraju slobodne radikale. Sposobnost antioksidacijskog sustava resica da reducira potencijalno štetne učinke slobodnih kisikovih radikala nužna je za uredno funkcioniranje posteljice, kao i osiguranje optimalnog rasta i razvoja fetusa (27). Sinciciotrofoblast (STB) tijekom trudnoće stalno raste i obnavlja se složenim procesima fuzije iz CTB-a, pri čemu se membrane stapaju, prolaze konformacijske promjene, postaju propusne, omogućavajući transfer jezgri, proteina i citoplazme u novonastale stanice STB-a. U početku je ubrzana proliferacija te diferencijacija stanica CTB-a nužna za izgradnju STB-a sukladno zahtjevima rastuće posteljice i embrija, a sredinom te pred kraj trudnoće služi za kontinuirano obnavljanje sloja STB-a (12, 28). Formiranjem sincicija prestaje dioba stanica i započinje intenzivna metabolička aktivnost, koja završava nakupljanjem starih jezgri kondenziranog kromatina i fragmenata DNK-a koje se povlače prema apikalnom kraju resice, pakiraju u sincicijske čvoriće i otpuštaju apoptozom u sistemsku cirkulaciju majke. Kontinuiran dotok svježih staničnih komponenti zahtijeva i kontinuirano otpuštanje starih jezgri iz sinciciotrofoblasta da bi se održala ravnoteža. Apoptoza je poseban oblik stanične smrti, nužan za održavanje stanične ravnoteže između gubitka i stvaranja stanica tijekom života (29). Apoptoza je sastavni dio životnog vijeka trofoblasta kako u viloznom tako i ekstraviloznom dijelu. Budući da se radi o aktivnom procesu koji zahtijeva utrošak energije, zovemo je i programirana smrt stanice, a odvija se bez aktivacije upalnih mehanizama. Pred kraj trudnoće otpušta se u vensku cirkulaciju majke i po nekoliko grama apoptotskog materijala dnevno koji je „upakiran“ u mjehuriće omeđene membranom te zbog toga nema upalne reakcije lokalnog tkiva. Sincicijske čvoriće uskoro fagocitiraju makrofazi u plućima i tako ih eliminiraju iz cirkulacije pa izostaje i majčin imuni odgovor (30).

### 1.2.3 Apoptoza, oksidativni stres trofoblasta u trudnoćama s preeklampsijom

Preeklampsija nastaje kao rezultat poremećene vilozne trofoblastne diferencijacije, koja vodi prekomjernom otpuštanju trofoblastnog materijala u cirkulaciju majke i posljedičnom oštećenju endotela antiangiogenim tvarima te pojačanog upalnog odgovora majke. Ako se poremećaj na razini trofoblasta dogodi rano, za vrijeme početne diferencijacije kod prelaska morule u blastocistu ili u fazi blastociste kad su diferencirani i VTB i EVTB, to će rezultirati

generaliziranim poremećajem obaju trofoblasnih linija. Takvo oštećenje rezultirat će nastankom PE i IUZR-a ili u ekstremnim slučajevima i spontanim pobačajem. Ako se poremećaj događa kasnije i pogađa diferencijaciju puta EVTB-a, to će rezultirati oštećenjem samo te linije što će se klinički manifestirati IUZR-om (8, 30). Poremećaji koji dovode do pojave PE u korelaciji su s izmijenjenom proliferacijom CTB-a ili poremećenom diferencijacijom i fuzijom u STB-u (28). Brojni citokini i faktori rasta, podrijetlom fetalnog ili majčinog okoliša, uključeni su u regulaciju životnog vijeka trofoblasta. Neki potiču sincicijalizaciju CTB-a, kao što je EGF (epidermalni faktor rasta). Poznati su i CSF (kolonija stimulirajući faktor), LIF (leukemija stimulirajući faktor), koji regulira dubinu invazije trofoblasta, te VEFG (vaskularni endotelijalni faktor rasta). Faktori koji inhibiraju sincicijalizaciju su tumor nekrotizirajući faktor-alfa (TNF-α) i transformirajući faktor rasta-beta (TGF-β). Izmijenjena lokalna koncentracija ovih faktora može dovesti do poremećaja u životnom ciklusu trofoblasta i PE. Za životni ciklus VT-a veoma su važni receptori za faktore rasta, kao i signalni putevi. Receptori s-Flt-1, receptor za VEGF i PLGF te s-Eng, receptor za TGF-β povišeni su kod pacijentica s PE i djeluju antiangiogeno. Povišena količina receptora vezuje slobodno cirkulirajuće faktore rasta i tako remeti nizvodne signalne putove stanica (12, 31). Rani razvoj posteljice započinje u uvjetima hipoksije koja djeluje inhibicijski na diferencijaciju i fuziju trofoblasta, a stimulira proliferaciju CTB-a potičući mitozu. U tim uvjetima oko 8. tjedna, prema teoriji „dva vala invazije trofoblasta“ započinje i invadiranje EVT-a u majčine spiralne arterije u decidui. Ako izostane ili je nepravilna invazija EVT-a u spiralne arterije, stvaraju se uvjeti za hipertoksični mikrookoliš (13, 32). Nedostatna i plitka invazija trofoblasta u vrhove spiralnih arterija decidue stvara uvjete za nastanak ishemija – reperfuzija ozljede (Slika 3).




Slika 3. Fiziološka pretvorba uterinih arterija u urednoj trudnoći i preeklampsiji. Preuzeto iz *Chaiworapongsa T, Chaemsaithong P, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. Nat Rev Nephrol. 2014 Aug;10(8):466-80.*

Ishemija označava stanje nedovoljnog protoka krvi s obzirom na potrebe tkiva, pri čemu osim navedenog, dolazi i do nepotpunog odstranjivanja metabolita. Reperfuzija je ponovna uspostava krvotoka nakon ishemije, a pojam ishemijsko-reperfuzijske ozljede označava sumu štetnih učinaka patofizioloških mehanizama ishemije i reperfuzije. Ovakva ozljeda stvara uvjete za razvoj oksidativnog stresa koji predstavlja stanje prekomjerne koncentracije prooksidansa koji nadvladaju puferske mehanizme antioksidansa. Poremećaj ravnoteže između prooksidansa i antioksidansa predstavlja podlogu za nastanak PE, ali i niza drugih patoloških stanja poput ateroskleroze, reumatoidnog artritisa i neurodegenerativnih bolesti (33). Nastali kisikovi i dušikovi slobodni spojevi, kao posljedica OS-a, inaktiviraju biomakromolekule, kompleksne stanične molekule, poput lipida, proteina i nukleinskih kiselina, dovodeći do lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija označava oštećenje oksidacijom tirozinskih i cisteinskih rezidua na proteinima kao i oksidativno oštećenje DNK-a, što rezultira disfunkcijom endotela,

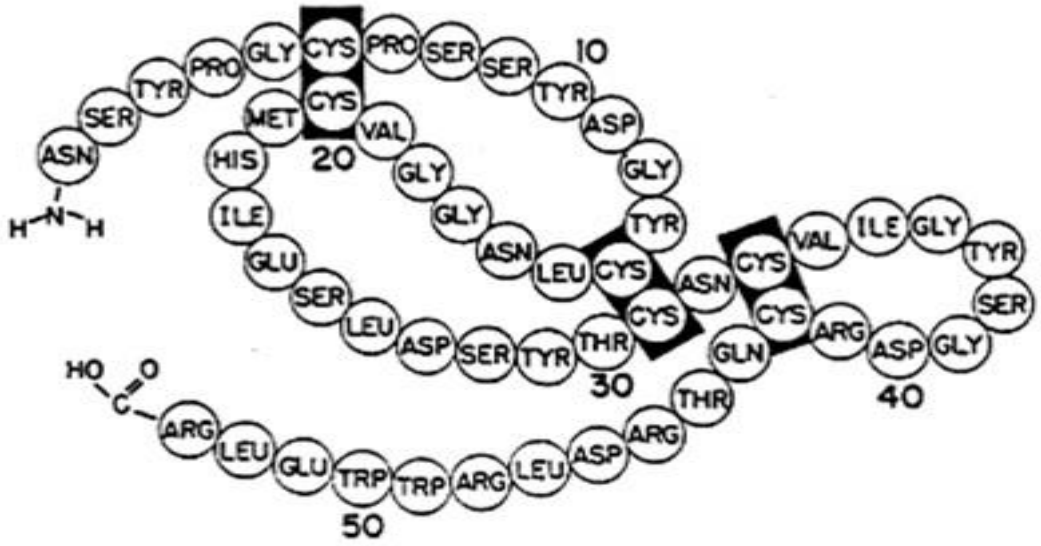
povećanim otpuštanjem antiangiogenih tvari poput sFlt--1 i s-Eng te povećanom apoptozom. Korionske resice rane trudnoće nemaju razvijen antioksidacijski sustav enzima koji služi zaštiti od spojeva generiranih OS-om. Prijevremeni porast koncentracije kisika, kao posljedica oksidativnog stresa, oštetit će i bazen matičnih trofoblastnih stanica CTB-a, koje su u kontaktu s bazalnom membranom usidrenih resica, utječući na količinu stanica koje će invadirati majčinu deciduu, ali i spiralne arterije u drugom valu invazije trofoblasta od 10. do 12. tjedna trudnoće u području prve trećine miometrija (34). Zbog nedovoljne i plitke invazije trofoblasta u spiralne arterije u drugom valu invazije, krvne žile ostaju užeg lumena, nedostatnog protoka krvi i očuvane vazokonstrikcije, što će i dalje podržavati hipoksiju. Hipoksija ubrzava životni vijek trofoblasta u PE ubrzavajući proliferaciju CTB-a, diferencijaciju i fuziju u STB te dovodi do povišenog otpuštanja apoptotskih sincicijskih čvorića (35). Povećan utok staničnog materijala iz CTB-a skratit će vrijeme dostatno za adekvatnu apoptozu pa dolazi do nekroze i aponekroze, koja aktivira enzime, dovodi do lokalnog oštećenja, otpuštanja vazoaktivnih čimbenika koji uzrokuju generaliziranu endotelnu disfunkciju (36). Za razliku od apoptotskih tjelešaca, koja se smatraju inertnim dijelovima staničnog debrisa i „upakirani“ su u staničnu membranu, aponekrozom se u cirkulaciju majke odbacuju mnogo manje čestice promjera manjeg od 100 nm, tzv. egzosomi ili placentom izlučeni glasnici (PSMs) koji su stabilniji, otporniji i prolaze u sistemsku cirkulaciju majke. U svom sastavu nose proteine koji imaju antiangiogeno, proinfalmatorno i prokoagulacijsko djelovanje, lipide, ali i mRNA, kao i dijelove DNK stanice od koje potječu te izazivaju ubrzan i jak majčin imuni odgovor. Redman i sur. pokazali su da PE nije samo bolest endotela, nego bolest pojačanoga imunog odgovora jer osim promjena u endotelu izaziva i promjene u koje je uključena mreža upalnih faktora. Sve navedeno dovodi do sistemske upale koja se ne iskazuje samo s parametrima akutne faze upalnog odgovora: povišene razine C reaktivnog proteina, povišene razine angiotenzinogena, nego i izmijenjenim metaboličkim odgovorom poput povišene inzulinske rezistencije i hiperlipidemije (37).

### 1.3 Faktori rasta: EGF i EGFR

Faktori rasta polipeptidne su signalne molekule koje kontroliraju proliferaciju, diferencijaciju stanica, apoptozu, sudjeluju pri lokalnoj upalnoj reakciji, angiogenezi, stvaranju međustaničnog matriksa i progresiji staničnog ciklusa (38). Djeluju vezivanjem na membranske stanične receptore i nakon toga aktiviraju lanac molekularnih procesa kojima je krajnji cilj započinjanje mitoze. Slijedi aktivacija različitih signalnih puteva koji pokreću diobu stanica (39). S obzirom

na svoju važnu ulogu, bilo kakav poremećaj ovih molekula osnova je za mnoge bolesti, uključujući i velik broj malignih bolesti.

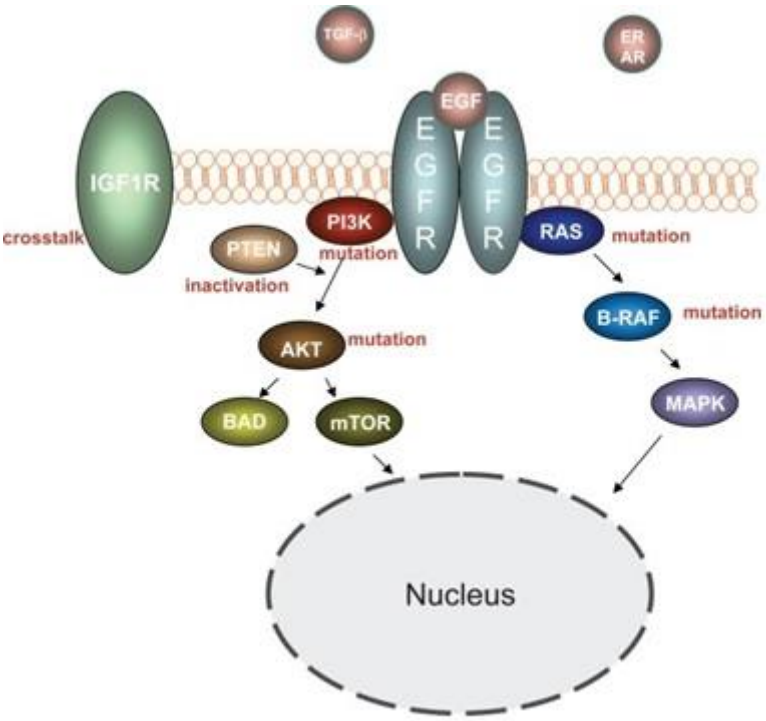
Epidermalni faktor rasta (EGF) jednolančani je polipeptid koji se sastoji od 53 aminokiseline spojene s trima disulfidnim lancima. Izoliran je 1960. godine iz mišje pljuvačne žlijezde, potom otkriven u humanom urinu, mlijeku, slini, kao i tkivu štitnjače, gušterače, crijeva, bubrega i u posteljici (40) (Slika 4).




Slika 4. Shematski prikaz molekula EGF-a. Dostupno na *https://www.sciencedirect.com/topics/veterinary-science-and-veterinary-medicine/epidermal-growth-factor* [pristupljeno 19.6.2020.]

Potiče proliferaciju epitelnih, mezenhimalnih i nekih tumorskih stanica. Utječe na implantaciju embrija, diferencijaciju trofoblasta, endokrinu funkciju posteljice i apoptozu (41). Obitelj EGF-a broji 14 različitih članova koji predstavljaju ligand za iste receptore, a neki od njih su: amfiregulin, neuregulin, HB-EGF, TGF-α. Ovisno o dobi trudnoće, EGF pokazuje dvojaku aktivnost na trofoblastu. Za vrijeme vrlo ranog razvoja posteljice, prije 6. tjedna trudnoće potiče proliferaciju citotrofoblasta (CTB). Od 6. do 12. tjedna trudnoće potiče lučenje hCG-a i hPL-a u sinciciotrofoblastu (STB) (42). EGF djeluje na ciljne stanice kroz vezivanje za receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR). Gen za EGFR nalazi se na kratkom kraku 7. kromosoma (7p11) i kodira 170-kDa težak tip I trasmembranskog receptora za EGF. EGFR je dio HER/Erb

obitelji tirozin-kinaznih receptora koja broji 4 receptorska člana. EGFR 1 nalazi se u trofoblastu resica posteljice (CTB-u i STB-u), dok se receptori EGFR2-4 nalaze i u EVTB-u. Vezivanjem EGF-a za EGFR potiče se unutarstanična tirozin-kinazna aktivnost i potom aktivacija promitogene signalne kaskade kroz autofosforilaciju tirozinskih rezidua na COOH-završnoj domeni EGFR-a (43) (Slika 5).




Slika 5. Shematski prikaz djelovanja EGF-a i EGFR-a. Preuzeto iz *Schuch G, Kobold S, Bokemeyer C. Evolving role of cetuximab in the treatment of colorectal cancer. Cancer Manag Res. 2009 Jul 23;1:79-88.*

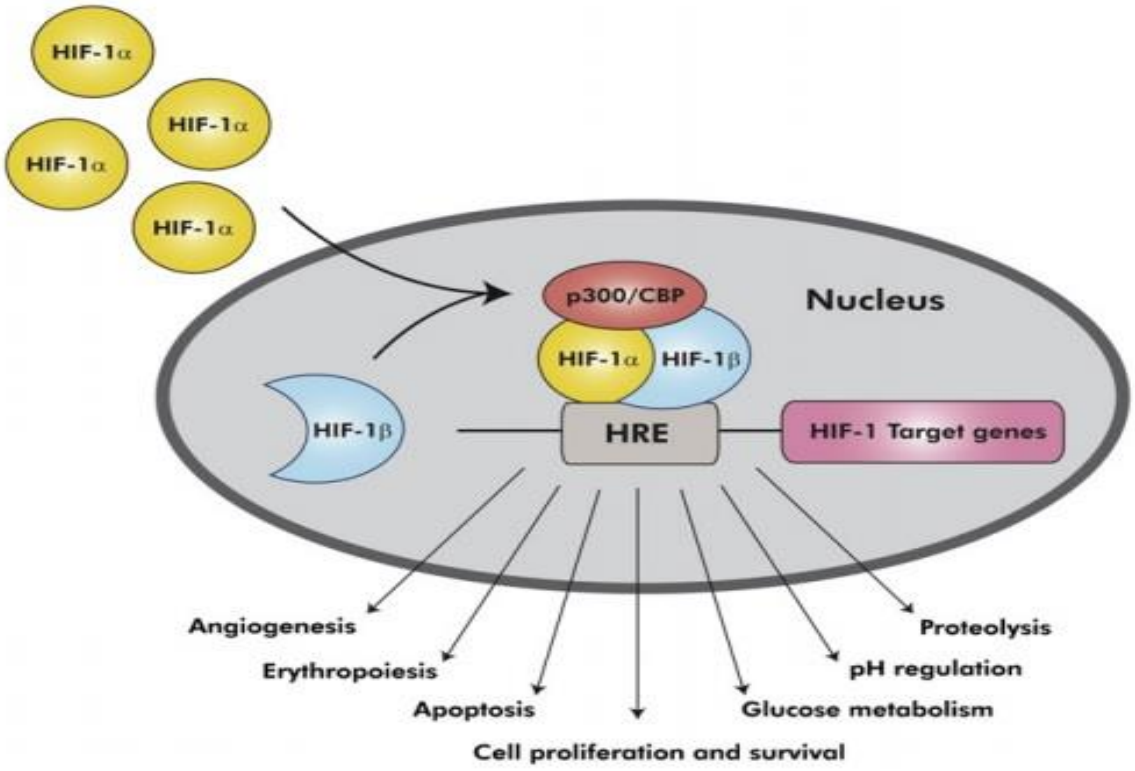
Daljnje unutarstanično signaliziranje ostvaruje se posredstvom MAPK puta, PI3K/ERK 1/2 puta, i m-TOR puta. U konačnici, EGFR-om posredovano signaliziranje povećava proliferaciju i angiogenezu, a smanjuje apoptozu (44).

EGFR je prisutan u humanoj posteljici i na stanicama decidue, a izraženost je potencirana različitim fiziološkim stimulansima. Porast broja receptora viđa se kod stvaranja STB-a, a smanjenje broja receptora viđa se kod patoloških trudnoća, kao što je IUGR, dok se smanjenje tirozin-kinazne aktivnosti receptora viđa kod pušačica (45). Broj receptora veći je u trudnoćama

s muškim fetusom. EGF kroz signalni put PI3K djeluje na inaktivaciju kaspaze 9, koja ima proapoptotsko djelovanje i tako blokira apoptozu izazvanu hipoksijom (46). Rana disfunkcija receptora za EGF moguća je poveznica između poremećaja u migraciji EVTB-a i loše perfuzije interviloznog prostora te nastanka bolesti trudnoće poput PE. HB-EGF, ligand za EGFR-1 receptor, signaliziranjem kroz PI3K put potiče pretvorbu iz proliferacijskog u invazivni EVTB (47). Oprečni su rezultati nekoliko studija u kojima je istražena izraženost receptora za EGF u posteljicama trudnoća kompliciranih PE. Milchev sa suradnicima utvrdio je smanjenu izraženost receptora za EGF u viloznom trofoblastu (VTB) posteljica s PE (48). Ferrandina i suradnici, koristeći se radioreceptorskim tehnikama u posteljicama trudnoća s hipertenzijom, pokazali su veću izraženost receptora za EGF (49). Pregledom dostupne literature nismo pronašli radove u kojima je cjelovito analizirana imunohistokemijska izraženost EGF-a i EGFR-a u terminskim posteljicama trudnoća kompliciranih PE zasebno za VTB, EVTB i decidualne stanice (DS).

## 1.4 Hipoksijom induciran faktor 1 α, HIF-1α

Hipoksijom inducirani faktor 1 alfa (HIF-1α) ključni je transkripcijski faktor koji ima središnju ulogu u staničnom odgovoru na hipoksiju u fiziološkim i patološkim stanjima (50). HIF-1α regatulor je homeostaze kisika i kod svih višestaničnih organizama neophodan je za pravilan razvoj posteljice (51). Hipoksijom inducirani faktor 1 alfa (HIF-1α) heterodimer je koji se sastoji od dviju podjedinica: konstitutivne HIF-1β te HIF-1α koja se stvara i stabilizira u uvjetima hipoksije. Razina HIF-1α podjedinice raste dramatično u uvjetima pada koncentracije kisika ispod 6 %, što odgovara parcijalnom tlaku kisika ispod 40 mm Hg. Pri urednom tlaku kisika, HIF-1α brzo se degradira. Proces degradacije zahtijeva dvostruku hidroksilaciju prolinskih rezidua na mjestima 402 i 564 prolil dehidrogenazama koje zahtijevaju kisik i α-ketoglutarat kao supstrat. Hidroksilirani HIF-1α veže se na von Hippel-Lindau tumor supresorski protein (VHL), koji privuče ubikvitin-ligazni kompleks i kao takav podliježe proteosomalnoj degradaciji (52). Istodobno se događa i hidroksilacija asparaginske rezidue na mjestu 803 putem hidroksilaze faktora inhibicije HIF-a (FIH). Tako se blokira međudjelovanje HIF-1α i koaktivatora p300 i CBP. Stanice izložene akutnoj hipoksiji uslijed nedostatka kisika iskazuju inhibiciju hidroksilacije, koja posljedično vodi stabilizaciji i transaktivacijskoj funkciji HIF-1α koji se dimerizira u jezgri s HIF-1β te slijedi transkripcija ciljnih genskih sekvenci u mRNA (53) (Slika 6).




Slika 6. Shematski prikaz djelovanja molekule HIF-1α. Preuzeto iz *Patel J, Landers K, Mortimer RH, Richard K. Regulation of hypoxia inducible factors (HIF) in hypoxia and normoxia during placental development. Placenta. 2010 Nov;31(11):951-7.*

Stanice izložene intermitentnoj hipoksiji koja uključuje kratke epizode hipoksije praćene produljenim periodima reoksigenacije pokazuju perzistentno povišenu transkripcijsku aktivnost HIF-1α. Njime se inducira transkripcija više od 20 gena koji utječu na povećano oslobađanje kisika u hipoksičnom tkivu. Upravo se izučavanjem specijaliziranih bubrežnih stanica koje luče eritropoetin (EPO), hormon koji se u hipoksiji izlučuje u krvotok, veže na receptore progenitorskih stanica i utječe na preživljavanje i diferencijaciju istih, došlo do otkrića HIF-1α. Ovaj faktor orkestrira ekspresijom brojnih gena koji kodiraju proteine odgovorne za dotok željeza u koštanu srž, sintezu hemoglobina, transferina, transportnih receptora, među kojima i receptor za eritropoetin (54). HIF-1α utječe na metabolizam glukoze, regulirajući glukozne transportere GLUT 1 i GLUT 3, čime utječe na ulazak glukoze u stanice. Kontrolira proliferaciju i apoptozu embrionalnih matičnih stanica regulacijom gena p53, p21 i

Bcl-2. Tijekom ranog razvoja posteljice od 7. do 9. tjedna, u uvjetima niskoga parcijalnog tlaka kisika, HIF-1α lokaliziran je u CTB-u i iskazuje svoj najveći izražaj, a od 10. tjedna trudnoće premješta se u STB u kojem je i najveća razina VHL--a, što ukazuje na nestanak i degradaciju HIF-1α. Drugi vršak pojavnosti iskazuje se od 14. do 18. tjedna kada se, zbog uspostavljanja placentne cirkulacije, povećava parcijalni tlak kisika, što ukazuje da razina HIF-1α može biti regulirana neovisno o hipoksiji (55). Brojni inflamatorni citokini, kao TNFα (eng. *Tumor necrosis factor alpha*), interleukini kao IL-6, angiotenzin II, ali i faktori rasta, mogu povisiti razinu tog transkripcijskog čimbenika (56). Mnogi dokazi podupiru tezu o HIF-u kao poveznici između placentarne hipoksije i nastalih antiangiogenih posrednika koji vode oštećenju endotela i PE. Rajakumar sa suradnicima dokazao je smanjenu proteosomalnu degradaciju HIF-1α u posteljicama iz trudnoća kompliciranih PE prije 34. tjedna trudnoće. Trajno povišen HIF-1α u uvjetima hipoksije izaziva izostanak pravilne diferencijacije trofoblasta, gubitak stjecanja invazivnog kapaciteta i plitku trofoblastnu invaziju karakterističnu za PE. U navedenim studijama analizirana je izraženost HIF-1α u posteljicama prvog trimestra trudnoće. Samo u jednoj studiji analizirana je imunohistokemijska izraženost HIF-1α u terminskim posteljicama iz trudnoća kompliciranih PE (57). U tom radu imunohistokemijski izražaj HIF-1α bio je veći na VTB-u i EVTB-u kod posteljica iz trudnoća kompliciranih PE u odnosu na posteljice kontrolne skupine, dok imunohistokemijski izražaj HIF-1α na DS nije istražen.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

Cilj istraživanja bio je odrediti imunohistokemijsku razinu sljedećih faktora koji su uključeni u razvoj PE:

a) Istražiti imunohistokemijsku razinu EGF-a u VTB-u, EVTB-u i DS-u primjenom imunohistokemijskog biljega za EGF u tkivu terminskih posteljica s PE i tkivu urednih terminskih posteljica te rezultate međusobno usporediti.

Očekivali smo da će imunohistokemijska razina EGF-a biti viša u ispitivanim dijelovima posteljica s PE u odnosu na posteljice urednih trudnoća.

b) Istražiti imunohistokemijsku razinu EGFR-a u VTB-u, EVTB-u i DS-u primjenom imunohistokemijskog biljega za EGFR u tkivu terminskih posteljica s PE i tkivu urednih terminskih posteljica te rezultate međusobno usporedi.

Očekivali smo da će imunohistokemijska razina EGFR-a biti viša u ispitivanim dijelovima posteljica s PE u odnosu na posteljice urednih trudnoća.

c) Istražiti proliferacijski indeks u posteljicama iz trudnoća kompliciranih PE i usporediti ga s proliferacijskim indeksom terminskih posteljica iz urednih trudnoća.

Očekivali smo viši proliferacijski indeks u ispitivanim dijelovima posteljica s PE u odnosu na posteljice urednih trudnoća.

d) Istražiti imunohistokemijsku razinu HIF1-α u VTB-u, EVTB-u i DS-u primjenom HIF-1α imunohistokemijskog biljega u tkivu terminskih posteljica s PE i tkivu urednih terminskih posteljica te rezultate međusobno usporediti.

Očekivali smo višu imunohistokemijsku razinu HIF-1α u ispitivanim dijelovima posteljica s PE u odnosu na posteljice urednih trudnoća.

# 3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

## 3.1 Materijal

Materijal predstavlja 29 terminskih posteljica iz jednoplodnih trudnoća s PE i 19 terminskih posteljica urednih trudnoća iz poroda na Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Split, odabranih po dolje navedenim kriterijima. Sve posteljice usklađene su prema dobi trudnoće, a patohistološki analizirane u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split.

**Kriteriji uključenja u studiju:**

Klinička dijagnoza PE:

- arterijska hipertenzija u prethodno normotenzivnih žena (sistolički tlak 140 mm Hg, dijastolički tlak 90 mm Hg)

- proteinurija 300 mg / 24 satnom urinu ili 1+ na test traci za proteine u urinu.

**Kriteriji isključenja iz studije:**

- arterijska hipertenzija te druge bolesti krvožilnog i bubrežnog sustava koje su postojale prije trudnoće

- HELLP sindrom po sljedećim kriterijima: broj trombocita < 100 x $10^{9}$/L, AST i ALT > 70 U/L, LDH > 600 IU/L, anemija, dva od tri parametra za hemolizu (snižen serumski haptoglobin, povišen serumski bilirubin, shistiociti u perifernom razmazu)

- višeplodova trudnoća.

Kontrolna skupina: posteljice iz jednoplodnih trudnoća prema istim standardima koji odgovaraju kriterijima uključenja i isključenja u studiju.

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

## 3.2 Metode istraživanja

### 3.2.1 Obrada i patohistološka analiza tkiva

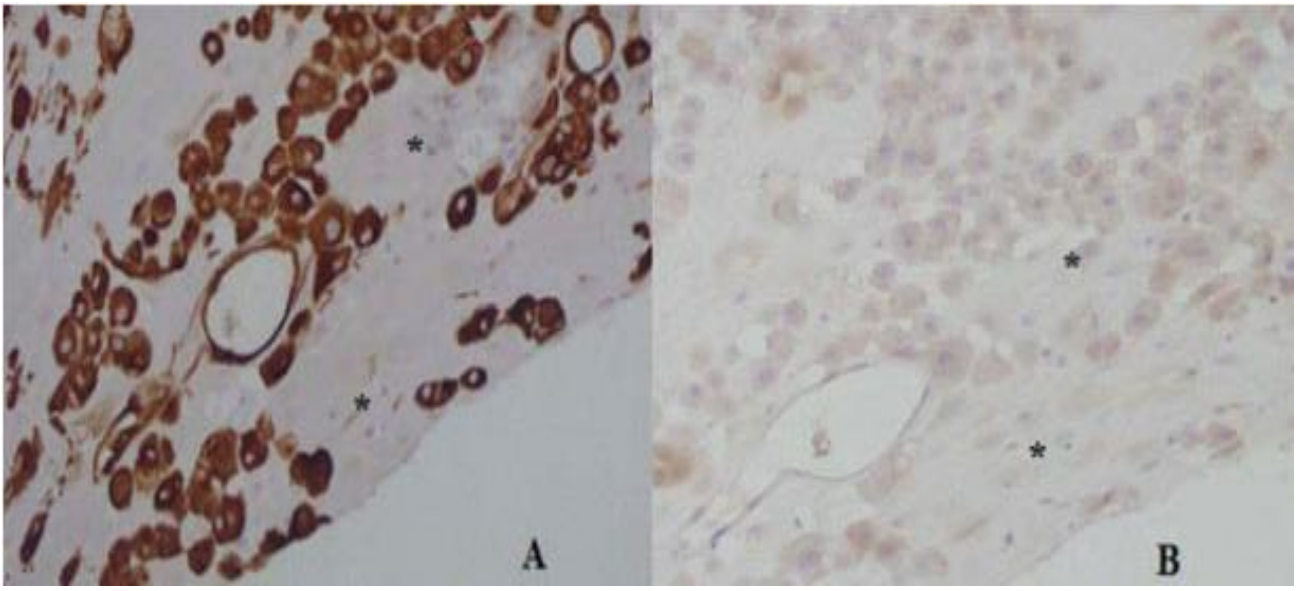
Posteljice su prikupljane unutar 20 minuta od poroda, fiksirane u 4 % formalinu te poslane u Zavod za Patologiju. Uzorci posteljice uzeti su s makroskopski urednog dijela posteljične ploče, što bliže insercijskom mjestu pupkovine i svi su sadržavali bazalnu deciduu. Posteljični uzorci potom su uklopljeni u parafinske blokove i rezani rotacijskim mikrotomom na 4 mikrometarske rezove, fiksirani na stakla i sušeni na 37 $^0$C. Nakon završene fiksacije uzorci su obojani hematoksilinom i eozinom. Za mikroskopsku analizu preparata korišten je mikroskop marke Olympus BX41. Brojanje je obavljeno uz pomoć programa Cell D1 Image analysis (Olympus). Radi točnije interpretacije sve uzorke pogledali su dva patologa.

### 3.2.2 Imunohistokemijsko bojanje

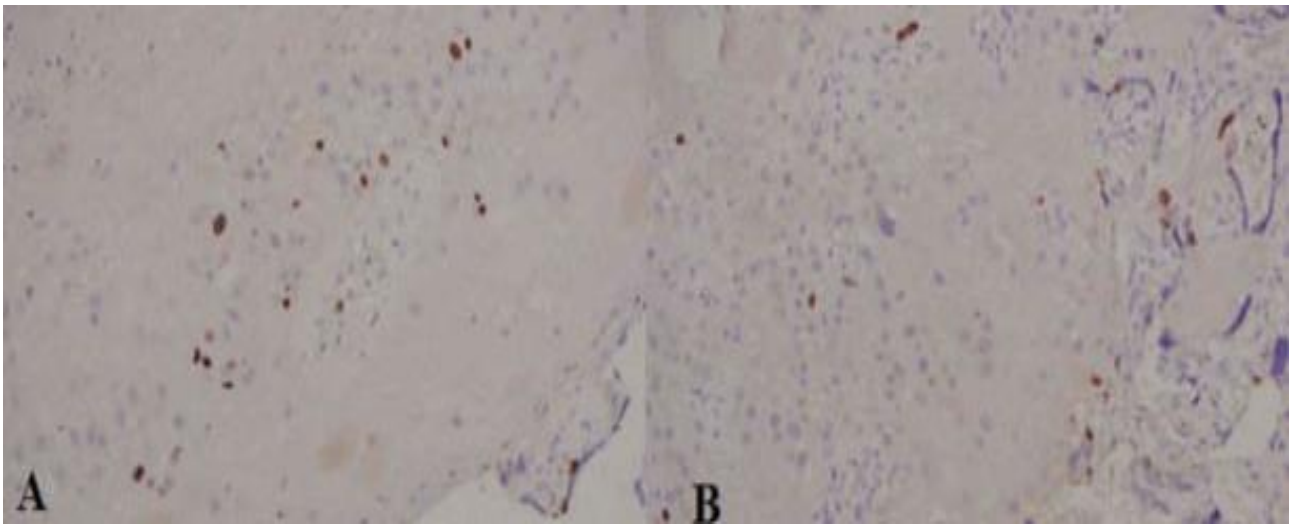
Imunohistokemijska analiza načinjena je na serijskim isječcima uzoraka posteljica na sljedeći način: rezovi iz parafinskih kocaka postavljeni su na superfrost stakla (*Thermoscientific, Germany*) i obrađeni u automatskom bojaču (*Ventana Bench mark Ultra Autostainer*, Ventana Roche, Tucson, Arizona, USA). Za razlikovanje DS od EVT stanica u decidui bazalis koristili smo primarno protutijelo CK 7 (zečje monoklonalno protutijelo, klon SP 52, Ventana, Tucson, Arizona, USA), a *Ultra Universal DAB detection kit* (Ventana, Tucson, Arizona, USA) koristili smo za vizualizaciju. EVT stanice bile su CK7 pozitivne, dok su DS stanice CK7 negativne. Proliferacija se potvrdila primarnim protutijelom Ki-67 (klon MIB1, DAKO, Glostrup, Danska), a kao sekundarno protutijelo koristili smo *Ultra Universal DAB detection kit* (Ventana, Tucson, Arizona, USA). Da bismo utvrdili izražaj EGF-a i EGFR-a, koristili smo sljedeća protutijela: zečje poliklonalno protutijelo klon Z-12 i mišje monoklonalno protutijelo, klon F4 (*Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, Dallas, Texas, USA), a kao sekundarno protutijelo *Ultra view Universal DAB detection kit* (Ventana, Tucson, Arizona, USA).

Primarno protutijelo za utvrđivanje izražaja HIF1-α zečje je poliklonalno IgG protutijelo klon H-206, (*Santa Cruz Biotehnology Inc.*, Dallas, Texas, USA), a sekundarno protutijelo *Ultra view Universal DAB detection kit* (Ventana, Tucson, Arizona, USA).

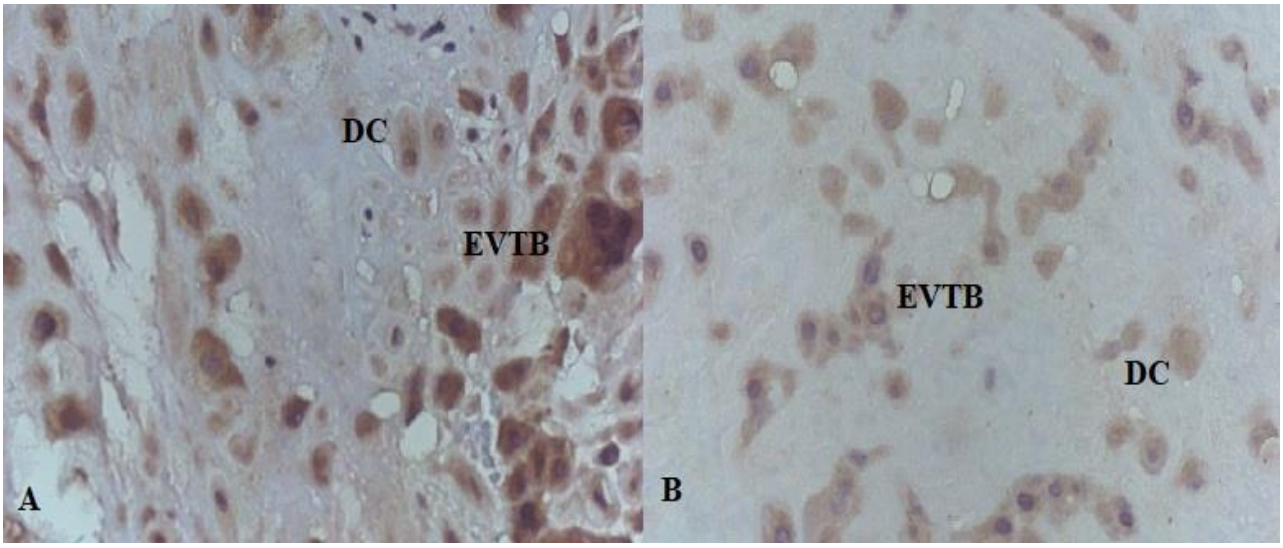
Smeđa obojanost jezgre smatrana je pozitivnom reakcijom za izražaj Ki-67 protutijela, dok se difuzno membransko i citoplazmatsko bojanje smatralo pozitivnim za izražaj EGF-a, EGFR-a i HIF-1α. Kao pozitivna kontrola za Ki-67, EGF i EGFR koristio se uzorak nesitnostaničnog karcinoma pluća, a za pozitivnu kontrolu HIF-1 α koristilo se tkivo sluznice debelog crijeva.



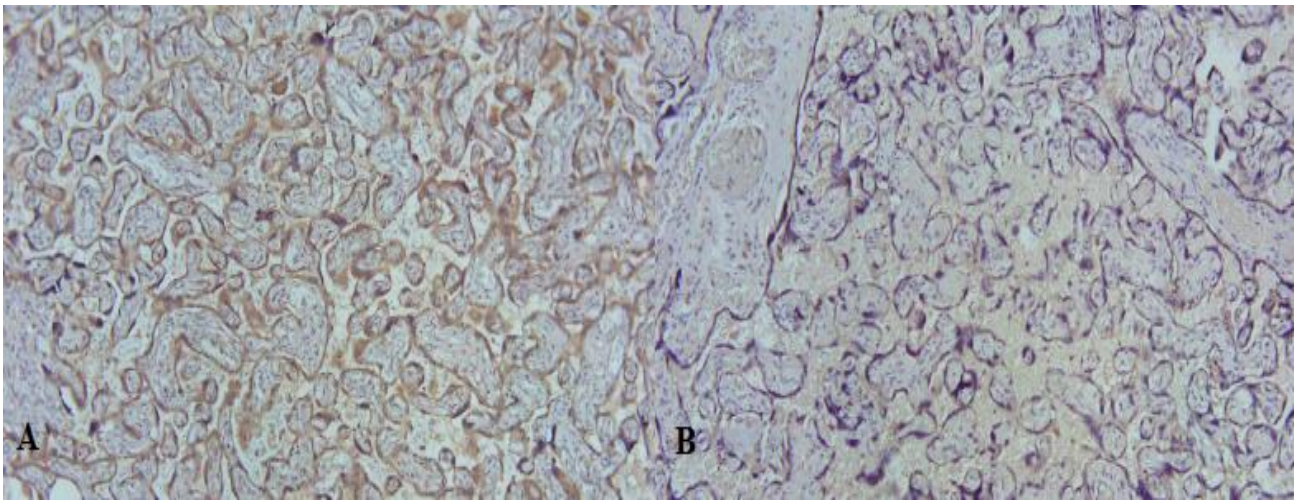

Slika 7. A. Imunohistokemijsko bojanje na citokeratin 7 (CK7). Ekstravilozni trophoblast (EVTB) je CK7 pozitivan, dok su decidualne stanice (DS) CK7 negativne. B. Imunohistokemijsko bojanje na receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) zabilježeno kao slabi izražaj (+). DS stanice su označene *. Povećanje 400x, Olympus Image analyser.




Slika 8. A. Imunohistokemijski izražaj proliferacijskog biljega Ki-67 u decidui posteljca trudnoća kompliciranih preeklampsijom (A) i posteljica urednih trudnoća (B). Povećanje 200x, Olympus Image Analyser.




Slika 9. Imunohistokemijski izražaj HIF-1α u decidualnim stanicama (DS) i ekstraviloznom trofoblastu (EVTB) u posteljicama iz trudnoća kompliciranih preeklampsijom odrđen kao jaki izražaj (A) i kontrolnih posteljica određen kao slabi izražaj (B). Povećanje 400x, Olympus Image Analyser.




Slika 10. Imunohistokemijski izražaj HIF-1α u viloznom trofoblastu (VTB) u posteljicama iz trudnoća kompliciranih preeklampsijom određen kao jaki izražaj (A) i kontrolnih posteljica određen kao slabi izražaj (B). Povećanje 400x, Olympus Image Analyser.

### 3.2.3 Statistički postupci

Da bismo uvidjeli razlike među ispitivanim skupinama (PE i kontrolna grupa) za ispitivano svojstvo koje predstavlja intenzitet imunohistokemijskog bojanja označen kao slabo, umjereno i jako, izračunali smo veličinu potrebnog uzorka. Dajući alfa razinu, tj. statističku značajnost od 0.05, uz snagu 80 % i umjereni efekt veličine (w = 0.3), minimalno smo ukupno trebali 39 posteljica ili minimalno 19 posteljica po ispitivanoj skupini. Veličinu uzorka izračunali smo koristeći program G*Power 3.0.10. Mjere centralne tendencije i varijabiliteta ispitivanih varijabli za dvije ispitivane skupine opisali smo srednjom vrijednosti sa standardnom devijacijom ili medijanima s interkvartilnim rasponom, ovisno o rezultatima distribucije prema Kolmogorov-Smirnovljev testu. Statistička analiza načinjena je programom Statistika 7.0, koristeći $\chi 2$-test, t-test za neovisne uzorke i Mann-Whitneyjev test, ovisno o raspodjeli.

## 4. REZULTATI

U Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Split, poštujući kriterije uključenja i isključenja iz studije, prikupljene su posteljice i podatci iz 29 trudnoća kompliciranih PE i 19 urednih trudnoća koje su predstavljale kontrolnu skupinu. Obrada i analiza posteljica učinjena je na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split.

### 4.1 Demografska obilježja skupina

Nije utvrđena statistički značajna razlika prema životnoj dobi, paritetu među rodiljama ispitivanih skupina, kao ni u dobi trudnoće i porodnoj masi ($P \geq 0{,}259$ za sve usporedbe) (Tablica 1). Nije bilo razlike u spolu među navedenim skupinama ($P = 0{,}135$) (Tablica 1).

**Tablica 1.** Demografske i kliničke karakteristike ispitivanih grupa

| | **Preeklampsija** (n=29) | **Kontrolna grupa** (n=19) | **P** |
|---|---|---|---|
| Dob rodilje (godine) | 28 (25 – 38) | 31 (28 – 36) | NS* |
| Paritet | 1 (1 – 2) | 1 (1 – 2) | NS* |
| Dob trudnoće (tjedni) | 38 (37 – 40) | 38 (38 – 39) | NS* |
| Porodna masa (g) | 3300 (2650 – 3670) | 3500 (3100 – 3710) | NS* |
| Spol (muško/žensko) | (20/9) | (9/10) | NS** |

Podatci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. *Mann-Whitneyjev test; **$\chi^2$-kvadrat test, NS = nije statistički značajno.

**Tablica 2.** Imunohistokemijski izražaj EGFR-a u decidualnim stanicama (DS), viloznom trofoblastu (VTB) i u ekstraviloznom trofoblastu (EVTB) u posteljicama iz trudnoća kompliciranih preeklampsijom (PE) te posteljicama iz kontrolne grupe.

| Intenzitet | EGFR DS | | | EGFR EVTB | | | EGFR VTB | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| bojanja | PE | CG | P | PE | CG | P | PE | CG | P |
| + | 8 (27,6%) | 1 (5,3%) | 0,124 | 6 (20,7%) | 1 (5,3%) | 0,255 | 6 (20,7%) | 1 (5,3%) | 0,119 |
| ++ | 10 (34,5%) | 8 (42,1%) | | 9 (31,0%) | 5 (26,3%) | | 9 (31,0%) | 5 (26,3%) | |
| +++ | 11 (37,9%) | 10 (52,6%) | | 14 (48,3%) | 13 (37,9%) | | 14 (48,3%) | 11 (37,9%) | |

Podatci (EGFR i EGF) su izraženi kao apsolutni brojevi slučajeva i postotci istih. Kao statistička metoda korišten je $\chi^2$-kvadrat test.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u imunohistokemijskom izražaju EGFR-a u DS-u, VTB-u i EVTB-u među ispitivanim skupinama (P = 0,124; P = 0,255; P = 0,119) (Tablica 2.)

**Tablica 3.** Imunohistokemijski izražaj EGF-a u decidualnim stanicama (DS), viloznom trofoblastu (VT) i u ekstraviloznom trofoblastu (EVTB) u posteljicama iz trudnoća kompliciranih preeklampsijom (PE) te posteljicama iz kontrolne grupe.

| Intenzitet bojanja | EGF DS | | P | EGF EVTB | | P | EGF VTB | | P |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | PE | CG | | PE | CG | | PE | CG | |
| + | 20 (69,0%) | 12 (63,2%) | 0,680 | 15 (51,7%) | 8 (42,1%) | 0,504 | 22 (75,9%) | 16 (84,2%) | 0,560 |
| ++ | 9 (31,0%) | 7 (42,1%) | | 13 (44,8%) | 1 (52,6%) | | 7 (24,1%) | 2 (10,5%) | |
| +++ | 0 | 0 | | 1 (3,4%) | 1 (5,3%) | | 0 | 1 (5,3%) | |

Podatci (EGFR i EGF) su izraženi kao apsolutni brojevi slučajeva i postotci istih. Kao statistička metoda korišten je $\chi^2$-kvadrat test.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u imunohistokemijskom izražaju EGF-a u DS-u, VTB-u i EVTB-u među ispitivanim skupinama (P = 0,680; P = 0,504; P = 0,560) (Tablica 3.)

**Tablica 4.** Proliferacijski indeks u decidualnim stanicama (DS) i ekstraviloznom trofoblastu (EVTB) posteljica iz trudnoća kompliciranih preeklampsijom (PE) i kontrolne grupe.

| Proliferacijski indeks | | | Proliferacijski indeks | | |
|---|---|---|---|---|---|
| DS | | | EVTB | | |
| PE | CG | P | PE | CG | P |
| 3.2 (0-13.68) | 0 (0-5.11) | 0,028 | 3.03 (1.38-24.00) | 0 (0-24.00) | 0,015 |
| Proliferacijski indeks | | | Proliferacijski indeks | | |
| PE | | | CG | | |
| DS | EVTB | P | DS | EVTB | P |
| 3.2 (0-13.68) | 3.03 (1.38-24.00) | 0,459 | 0 (0-5.11) | 0 (0-24.00) | 0,505 |

Proliferacijski indeks značajno je viši u skupini posteljica iz trudnoća opterećenih PE i to u DS-u i u EVTB-u u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P < 0,028$ v.s $P = 0,015$).

Iako je proliferacija viša u DS-u i EVTB-u kod posteljica iz trudnoća opterećenih PE-om u odnosu na kontrolnu skupinu, rezultati nisu statistički značajni ($P = 0,459$ i $P = 0,505$, Tablica 4.)

**Tablica 5.** Imunohistokemijski izražaj HIF-1 alfa u decidualnim stanicama (DS), viloznom trofoblastu (VT) i u ekstraviloznom trofoblastu (EVTB) u posteljicama iz trudnoća kompliciranih preeklampsijom (PE) te posteljicama iz kontrolne grupe.

| | **Preeklampsija (n=29)** | **Kontrolna grupa (n=19)** | **P** |
|---|---|---|---|
| DS | | | |
| + | 1 (3,4 %) | 9 (47,4 %) | |
| ++ | 11 (37,9 %) | 9 (47,4 %) | 0,0001* |
| +++ | 17 (58,6 %) | 1 (5,3 %) | |
| VTB | | | |
| + | 0 | 9 (47,4 %) | |
| ++ | 6 (20,7 %) | 5 (26,3 %) | 0,0001* |
| +++ | 23 (79,3 %) | 5 (26,3 %) | |
| EVTB | | | |
| + | 0 | 6 (31,6 %) | |
| ++ | 1 (3,4 %) | 4 (21,1 %) | 0,0003* |
| +++ | 28 (96,6 %) | 9 (47,4 %) | |

HIF-1 alfa imao je statistički značajno jaču imunohistokemijsku ekspresiju u DS ($\chi^2$ = 19,589, DF = 2, P = 0,0001), VTB ($\chi^2$ = 19,422, DF = 2, PE = 0,0001) i EVTB ($\chi^2$ = 16,175, DF = 2, P = 0,0003) u posteljicama iz trudnoća s PE-om u usporedbi s kontrolnom grupom.

HIF-1 alfa imunohistokemijska ekspresija bila je najintenzivnija u EVBT-u, u usporedbi s VTB-om i DS-om iz posteljica trudnoća kompliciranih s PE-om ($\chi^2$ = 13,010, DF = 4, P = 0,0112), kao i u kontrolnoj skupini ($\chi^2$ = 9,483, DF = 4, P = 0,0501).

## 5. RASPRAVA

PE je multisistemska bolest trudnoće koja nepovoljno utječe na gotovo sve vitalne organe trudnice. Brojne studije posljednjeg desetljeća doprinose boljem razumijevanju molekularne osnove bolesti (5). Neadekvatno remodeliranje spiralnih arterija od strane EVTB-a vodi smanjenoj placentnoj perfuziji i hipoksiji posteljice. U posteljicama iz PE uteroplacentalna cirkulacija snižena je i do 50 % u odnosu na posteljice normalne trudnoće. Kao posljedica izostanka fiziološke pretvorbe spiralnih arterija, intermitentni protok arterijske krvi generira ponavljane epizode ishemije – reperfuzije – te dovodi do nastanka oksidativnog stresa (10). OS stimulira produkciju i otpuštanje proinflamatornih citokina i vazoaktivnih tvari, što će rezultirati generaliziranim oštećenjem endotela, vaskularnom inflamacijom i vazokonstrikcijom (7, 9, 10). Upravo se oksidativni stres nameće kao etiološka poveznica disfunkcije posteljice i endotela krvnih žila majke (11).

Faktori rasta, njihovi receptori, kao i transkripcijski faktori uključeni su u životni ciklus trofoblasta, prve stanične fetalne linije neophodne za adekvatnu placentaciju. Važnost navedenih faktora neophodna je u održavanju životnog vijeka trofoblasta koji je nužan za pravilnu pretvorbu spiralnih arterija neposredno nakon implantacije (14). Budući da se smatra da je PE bolest rane placentacije, veći dio studija izučavao je faktore rasta u posteljicama prvog trimestra. Prema dostupnoj literaturi, vidljivo je da je mali broj studija proučavao faktore rasta u posteljicama trudnoća s PE, a većina ih se odnosi na rane PE. Rezultati studija oprečni su – neke su ukazale na povišenu razinu, a neke na sniženu ili neizmijenjenu razinu faktora rasta. Cilj naše studije bio je istražiti imunohistokemijski izražaj faktora rasta EGF-a i EGFR-a, kao i transkripcijskog faktora HIF-1α posebno za svaki segment posteljice, od majčinog odjeljka (DS) do fetalnog odjeljka (VTB i EVTB), kao i proliferaciju u DS-u i EVTB-u kod terminskih posteljica s PE te ih usporediti s teminskim posteljicama iz urednih trudnoća. S obzirom na važan utjecaj EGF-a, EGFR-a i HIF-1α faktora na proliferaciju i diferencijaciju trofoblasta, kao i gotovo istodobnu vremensku izraženost ovih faktora te njihovu moguću interakciju, odlučili smo ispitati njihov izražaj u terminskim posteljicama s PE. Prema nama dostupnoj literaturi, nijedna studija do sada nije proučila imunohistokemijski izražaj navedenih čimbenika zasebno za sve navedene odjeljke posteljice i usporedila rezultate dobivene na posteljicama iz kasnoh PE s onima iz urednih terminskih trudnoća.

Proliferacija je neophodna za pravilan rani razvoj posteljice. Kroz sinkronizirano djelovanje EGF-a i EGFR-a potiče se rana ubrzana proliferacija EVTB-a i DS-a. Niti jedna dostupna

studija nije istraživala proliferaciju zasebno u DS-u i EVTB-u u posteljicama terminskih trudnoća s PE.

Prilikom osmišljavanja studije jasno smo odredili kriterije uključenja i isključenja iz studije kako bismo osigurali da ispitivanu skupinu čine posteljice terminskih trudnoća s PE, a kontrolnu terminske posteljice urednih trudnoća. Nepostojanje razlika u životnoj dobi, dobi trudnoće, paritetu rodilja, kao i spolu i porodnoj masi novorođenčadi među ispitivanim skupinama ukazuje na dobro usklađene skupine. Rezultati naše studije ukazuju da nije postojala statistički značajna razlika u izražaju faktora EGF-a i EGFR-a u DS-u EVTB-u i VTB-u između terminskih posteljica s PE i kontrolne skupine. Dostupna literatura ukazuje na oprečne rezultate u odnosu na naše istraživanje. U dosadašnjim radovima ispitivanu skupinu često su činile posteljice iz trudnoća s ranim PE uz IUZR. Razlici između naše i dosadašnjih studija doprinosi i korištenje različitih tehnika ispitivanja, a ako se i koristila imunohistokemijska analiza, nisu analizirani svi segmenti posteljice, tj. majčin i fetalni odjeljak. Milchev sa suradnicima ukazuje na niži imunohistokemijski izražaj EGFR-a, ali samo u VTB-u kod posteljica s PE (50), dok Ferrandina ukazuje da su hipertenzivne bolesti trudnoće, uključujući i PE, združene s povišenom koncentracijom EGFR-a koristeći se radioreceptorskom tehnikom. Analizom posteljičnog tkiva goveda, Akbalik ukazuje na povišen imunohistokemijski izražaj svih četiriju EGFR-ova, kao i EGF-a te amfiregulina (AREG) i epiregulina (EREG). Iako se imunohistokemijski izražaj smanjuje od rane prema terminskoj trudnoći, aktivnost EGFR-a održana je do kraja trudnoće, sugerirajući važnu ulogu na funkciju proliferacije i diferencijacije ranog trofoblasta, ali i moguć parakrini utjecaj na stanice strome korionskih resica u kasnoj trudnoći. Randall Armant i suradnici uspoređivali su imunohistokemijski izražaj različitih liganda za EGFR u posteljicama s PE, kao i njihovu koncentraciju u plazmi te su našli snižen izražaj EGF-a i HB-EGF-a, dok betacelulin (BTC) i amfiregulin (AREG) nisu bili sniženi. Autori ukazuju na krnju varijantu receptora EGFR-a, kojoj nedostaje intracelularna komponenta, pa izostaje prijenos signala u stanicu. Sve navedene studije nisu izučavale izražaj navedenih faktora rasta i receptora zasebno u DS-u, EVTB-u i VTB-u, nego su se bazirale na imunohistokemijskom izražaju u VTB-u, stoga rezultati njihovih istraživanja nisu u cijelosti usporedivi s našim rezultatima. Rezultati našeg istraživanja nisu pokazali razliku u imunohistokemijskom izražaju EGF-a i EGFR-a u različitim posteljičnim odjeljcima. Iako su autori drugih studija našli povišen imunohistokemijski izražaj EGF-a i EGFR-a u ranoj trudnoći, postoji mogućnost da se taj izražaj u kasnijim fazama trudnoće gubi bez utjecaja na razvoj PE. Budući da znamo da postoje četiri receptora i, za sada poznatih, četrnaest liganda te

barem tri signalna puta preko kojih navedeni ostvaruju svoje djelovanje, moguće je da drugi ligandi poput HB-EGF-a ne EGF utječu više na pojavnost PE u terminskim posteljicama.

Većina dosadašnjih studija istraživala je prostornu i vremensku lokalizaciju HIF-1α u posteljicama prvog trimestra trudnoće (57). Studija Lamarce i suradnika ukazuje na povišen izražaj transkripcijskog faktora HIF-1α u posteljicama s PE (60). Brojni dokazi o faktoru HIF-1α kao mogućem patogenetskom uzroku PE proizlaze iz analiza posteljica u žena koje žive na visokim nadmorskim područjima. HIF-1α predstavlja molekularnu poveznicu između placentalne hipoksije i medijatora PE, koju karakterizira trajno povišen HIF-1α čime utječe na pojačanu transkripciju gena za produkciju antiangiogenih biljega kao što su sFlt-1, s-Eng, ET-1. Cannigia i Winter ukazuju na povišen izražaj HIF-1α na razini mRNA i proteinskoj razini u posteljicama s PE (61). Novije studije ukazuju na mogućnost povišenog izražaja HIF-1α neovisno o hipoksiji te mogućnost da i drugi faktori osim kisika reguliraju izraženost ovoga transkripcijskog faktora. Inflamatorni citokini, angiotenzin II, interleukin-6 dovode do povišene razine HIF-1α u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila bubrega i hepatocitima. Radovi Richard DE. i sur. opisuju utjecaj faktora rasta na povišen izražaj HIF-1α kroz mehanizam koji uključuje receptor tirozin kinaze. Ova receptorom posredovana aktivacija HIF-1α uključuje fosfatidil-inozitol 3 (PI-3K) i MAPK signalni put, kroz koje signaliziraju i EGF i HB-EGF te ostvaruju moguću interakciju. Upalni čimbenici poput lipopolisaharida dovode u normoksiji do povišenog izražaja HIF-1α, što ukazuje na preklapanje između oksidativnog i upalnog stresa kao uzroka PE. Brojni radovi ukazuju na povišen izražaj HIF-1α kod različitih patoloških stanja poput karcinoma, čiji je rast obilježen hipoksijom. Zhang sa suradnicima ukazuje na povišen izražaj HIF-1α u serumu pacijenata s hepatocelularnim karcinomom. Rajakumar i Conrad dokazali su da se izražaj HIF-1α i HIF-2α snižava u posteljicama napredovanjem trudnoće (62). Rezultati naše studije vezani uz izražaj HIF-1α u posteljicama trudnoća s PE kompatibilni su s dosad ispitivanim studijama. Naša studija prvi je put pokazala da je HIF-1α pojačano izražen i u VTB-u, EVTB-u i DS-u. Navedeno ukazuje da se i majčin i fetalni odjeljak ponašaju isto u odnosu na hipoksiju te iskazuju povećan izražaj transkripcijskog faktora HIF-1α. Hipoksija u kasnom prvom trimestru trudnoće predstavlja nefiziološko stanje i odgovorna je za stvaranje ishemija/reperfuzija ozljede endotela i generiranje oksidativnog stresa. Iako posteljica treba sve više razine kisika za neometan razvoj, sposobna je na metaboličke adaptacije te svoj strukturni i funkcionalni integritet može održavati i u uvjetima stabilno niskih koncentracija kisika. Adaptacija na navedeno stanje odražava se djelomičnom sintezom proteina, kao i povišenim kapacitetom anaerobne glikolize. Hipoksija u trećem trimestru kod prethodno normalno

razvijenih posteljica objašnjava se zbijanjem resica nakon što posteljica dosegne potpuni potencijal rasta unutar zadanog prostora. Zbog navedenog dolazi do smanjenog interviloznog protoka s efektom fluktuiranja u dotoku majčine krvi te jako snižene koncentracije kisika upravo u trenutcima kada je i placentna i fetalna potreba za kisikom najveća. Ovo objašnjenje istovjetno je s povećanom incidencijom PE pred kraj trudnoće. Sve posteljice iskazuju neki stupanj kronične ishemije (reperfuzija ozljede), dok posteljice s PE predstavljaju ekstreman spektar oksidativnog stresa. Oksidativni stres preklapa se s majčinim upalnim odgovorom koji je blago naglašen kod uredne trudnoće te jako ubrzan i naglašen u PE. Povišen izražaj HIF-1α združen je s povišenim koncentracijama sFlt 1 u serumu majki koji direktno oštećuje endotel krvnih žila te sniženom koncentracijom PIGF-a, proangiogenog faktora koji također održava normalnu endotelnu strukturu i funkciju. Poznato je da se u PE u majčinu cirkulaciju pojačano otpuštaju i sFlt 1 i PIGF te se otkrićem ovih trofoblastom posredovanih biljega smatralo da su otkriveni biomarkeri PE. sFlt je protein koji nastaje kao pozitivan odgovor stanice na stres, npr. na hipoksiju ili oksidativni stres. Povišen cirkulirajući sFlt i snižen PIGF smatraju se biljezima STB stresa radije nego biljezima PE. Tijekom uredne trudnoće razina sFlt-a konstantna je od 30. do 32. tjedna, a potom raste. Razina PIGF-a konstantno raste do 30. tjedna i potom pada. Očito je da STB postaje podložan povećanom stresu posljednjih 8 do 10 tjedana trudnoće radi prethodno navedene kongestije viloznog trofoblasta unutar zadanog prostora uterusa. Upravo limitiran prostor kavuma uterusa, remodeliranje spiralnih arterija koje nije načinjeno po principu sve ili ništa, kao i smanjenje ili gotovo nedostatak matičnih CTB stanica, koje će nadomjestiti STB stanice, odražava se na funkcioniranje terminske posteljice. Stres STB-a i biljezi stresa mogu predvidjeti rano nastalu PE združenu s lošom i plitkom placentacijom prvog trimestra, dok isti biljezi u terminu kod pacijentica bez kliničkih pokazatelja PE ukazuju da njihove posteljice pokazuju znakove stresa i istog staničnog odgovora na kasnu hipoksiju. Zbog navedenog, sve se postterminske trudnoće smatraju pseudonormalnim. Imajući u vidu da je kraj trudnoće utrka između urednog završetka, tj. poroda i lošeg ishoda, tj. iznenadne smrti, otkriti povišene biljege STB stresa omogućava odrediti termin poroda. Uz klasične rizične faktore za PE, postoje i genetski rizični faktori, kao što su povišena razina PAI-1 i sFlt 1 koji povezuju nastanak PE, ali i rizik za postojanje koronarne srčane bolesti i srčanog zatajenja (65). Razina sFlt-a pada nakon poroda posteljice, ali kod pacijentica s PE i nakon poroda perzistentni antiangiogeni milje doprinosi daljnjem oštećenju endotela te povišenom riziku za kardiovaskularne bolesti. Pojedine studije ukazuju na perzistenciju sFlt-a i nakon 18 mjeseci od poroda neovisno o BMI-u, pušenju ili povišenom tlaku. Izvor sFlt-a nakon trudnoće su mononukleari u perifernoj krvi (66). Pacijentice nakon PE imaju i kronični upalni odgovor kao

posljedicu imunološke memorije kroz aktiviranje T-pomoćničkih stanica i povišeno stvaranje specijaliziranog oblika IgG-a u obliku AT1-AA. Navedena ostatna prolongirana kronična upala dovodi i do rizika za kasnije autoimune bolesti tijekom života. Oksidativni i upalni stres u posteljicama s PE dovodi do aktivacije STB-a, koji potom otpušta u cirkulaciju majke brojne mikrovezikule – egzosome (63). Egzosomi sadrže proteine, dijelove DNK-a, enzime koji imaju proinflamacijsku, antiangiogenu i prokoagulacijsku aktivnost koja doprinosi ubrzanom sistemskom upalnom odgovoru u PE (64). Ubrzano otpuštanje celularnog debrisa kroz egzosome praćeno je povećanom trofoblastnom proliferacijom kako bi se kompenzirao gubitak trofoblasta.

U našoj studiji istražili smo i proliferaciju zasebno u DS-u i EVTB-u. Proliferaciju smo iskazali kao proliferacijski indeks, koji smo dobili označavanjem primarnim protutijelom Ki-67. Pozitivnu reakciju predstavljala je smeđa obojenost jezgre, a kao kontrolu za Ki-67, EGF i EGFR koristilo se tkivo nesitnostaničnog karcinoma pluća. Izražaj Ki-67 računao se kvantitativno, kao udio pozitivno obojenih stanica u ukupnom broju stanica. Rezultati istraživanja ukazuju na gotovo tri puta viši proliferacijski indeks u DS-u i EVTB-u posteljica s PE u odnosu na kontrolnu skupinu. Proliferacija je viša u DS-u u odnosu na EVTB kod obje ispitivane skupine, ali rezultati nisu statistički značajni. Prema dostupnoj literaturi, nijedna studija nije izučavala proliferaciju u DS-u terminskih posteljica s PE, nego je fokus bio na proliferaciji u posteljicama rane trudnoće, tj. prvog trimestra, uvažavajući značaj decidualizacije stromalnih stanica endometrija kao preduvjeta uspješne implantacije i uredne trudnoće (61). Viši proliferacijski indeks u bazalnoj decidui posteljica s PE u odnosu na kontrolnu skupinu može ukazivati na kompenzatorni mehanizam, kao posljedicu neadekvatne proliferacije i diferencijacije u početku trudnoće. Glavno ograničenje studije predstavljala je interpretacija imunohistokemijskog izražaja izučavanih faktora unutar bazalne decidue jer je zahtijevala razlikovanje između EVTB-a i DS-a, što je nemoguće standardnim hemalaun-eozinskim bojanjem. Da bismo izdvojili i prepoznali razlike u EVTB-u i DS-u, načinili smo obilježavanje citokeratinskim protutijelom (CK7). EVTB je citokeratin pozitivan, a DS je citokeratin negativan. Imunohistokemijska interpretacija definirana je pregledom od strane dvaju nezavisnih perinatalnih perinatologa uz neznačajnu interopservacijsku varijabilnost (kappa = 0,82). Svi preparati analizirani su Olympus X41 mikroskopom uz povećanje od 40x. Iako je korištenje imunohistokemije kvalitativna metoda, zbog dobre obojenosti preparata i različitih intenziteta boje, HSCORE način procjene imunohistokemijske razine protutijela nije imao smisla. Bez imunohistokemije nemoguće je ispitivati pojedine segmente posteljičnog

tkiva kao zasebnih cjelina u istom uzorku i tako ova vrsta istraživanja ostaje nadređena složenijim metodama kao što je PCR ili *Western blot*. Dvostruko bojanje bi možda bilo prikladnije, ali nije bilo opcija jer je imunohistokemijsko bojanje EGF-a, EGFR-a i CK7 i membransko i citoplazmatsko. U urednoj, ranoj trudnoći razina EGFR-a u korelaciji je s procesom decidualizacije i diferencijacije CTB-a u EVTB-u. U urednoj terminskoj trudnoći, razina EGFR-a i više je povezana sa stimulacijom STB-a, a manje s diferencijacijom CTB-a jer je u terminskoj posteljici fokus na VTB-u, koji je nužan za poticanje neometanog fetalnog rasta. Pojednostavljeno gledajući, DS predstavlja majčin odjeljak, dok EVTB čine stanice fetalnog podrijetla. Interakcija među navedenim stanicama ili između majke i fetusa utječe na kreiranje povoljnog mikrookoliša neophodnog za održavanje i nastavak uredne trudnoće. Rezultati naše studije ukazuju na viši proliferacijski indeks u DS-u i EVTB-u posteljica s PE, što upućuje na neadekvatnu DS i EVTB proliferaciju u ranim stadijima trudnoće koji se nastavljaju u kasnijim stadijima i pridonose razvoju PE.

PE, bolest trudnoće koja može ugroziti i majku i dijete, generira kroničnu upalu te dovodi do rizika za kasniji dijabetes, aterosklerozu i autoimune bolesti tijekom života. Možda će terapija koja će suprimirati imuni odgovor poboljšati ishod trudnoće, kao i utjecaj na kasniji razvoj navedenih bolesti kod majke i potomstva nakon trudnoće s PE? Ako je oksidativni stres poveznica između hipoksije i PE, moguće da će terapija antioksidansima prevenirati nastanak bolesti? Brojne studije pokazuju utjecaj vitamina C i E, ali uz kontradiktorne rezultate. Gasotransmiteri predstavljaju novu nadu jer uz antioksidacijsko djelovanje utječu i na vazodilataciju. U novim radovima korištenje L-arginina kao prekursora NO-a ukazuje na smanjenu pojavnost PE. U potencijalnom budućem tretiranju PE ispituje se i pravastatin, statin koji se koristi u tretmanu prevencije kardiovaskularnih bolesti te smanjuje razinu sFlt-a i povećava razinu PIGF-a. Pored navedenog djelovanja, pravastatin povećava otpuštanje NO-a i CO-a te tako te na taj način omogućava dostupnost gasotransmitera s vazodilatacijskim efektom (67). Proučavajući utjecaj faktora rasta EGF-a, njegova receptora EGFR-a i transkripcijskog faktora HIF-1α na pojavu PE, očito je da se pojavljuju gotovo u isto vrijeme ranoga razvoja posteljice, imaju zajedničke signalne puteve kojima nose u stanicu šifre za proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu. Mogućnost da se terapijski interferira kroz signalne puteve MAPK, PI3K ili m-Tor put omogućilo bi poništavanje utjecaja spajanja navedenih faktora i receptora. Zaključno, do konačne primjene mogućih terapijskih opcija ostaje pitanje češćeg korištenja starog i poznatog lijeka LMWH-a, koji osim antitrombotskog efekta ima i o antitrombinu neovisne utjecaje na preživljavanje trofoblasta. LMWH potiče trofoblastnu proliferaciju i

diferencijaciju STB-a, povećava invaziju EVTB-a te iskazuje citoprotektivni efekt. Neovisno o funkciji trofoblasta, LMWH može umanjiti simptome bolesti kroz direktan utjecaj na funkciju endotela i angiogenezu (68). HB-EGF signalni put potiče invaziju trofoblasta i iskazuje citoprotektivan efekt na trofoblast tijekom prvog trimestra, a LMWH povećava sekreciju HB-EGF-a. Kroz mehanizam ovisan o signalnom putu HB-EGF-a, LMWH reducira apoptozu uzrokovanu hipoksija/reoksigenacija ozljedom. Važnost molekularnog dijaloga između HB-EGF-a i LMWH-a omogućava nove spoznaje o dobrobiti LMWH-a u liječenju posteljicom posredovanih bolesti trudnoće. Ove nove spoznaje mogu koristiti u liječenju rizičnih pacijentica, čak i u odsutnosti otkrivene trombofilije ili protrombotskih stanja (69,70).

Naša studija pokušala je dati odgovore o ulozi i važnosti faktora rasta te transkripcijskih faktora kao mogućih etioloških faktora u nastanku PE. Analizirajući zasebno sve odjeljke posteljice i imunohistokemijski izražaj ispitivanih faktora u svakom odjeljku, što dosad nije bio slučaj, doprinijeli smo boljem razumijevanju odgovora na hipoksiju u posteljici trećeg trimestra. Dokazali smo da se i majčin i fetalni odjeljak ponašaju jednako u hipoksičnom miljeu, tj. iskazuju viši imunohistokemijski nivo transkripcijskog fakotra HIF-1α. Iako nismo dokazali višu razinu EGF-a i EGFR-a što smo očekivali, moguće je da se uloga ovog faktora rasta gubi napredovanjem trudnoće, dok ostali ligandi za EGFR ostvaruju svoje djelovanje pred kraj trudnoće. Buduća istraživanja trebala bi tragati za drugim faktorima rasta kao mogućim pokretačima poremećenoga životnog vijeka trofoblasta rane trudnoće kako bi se njihovom blokadom napokon omogućilo ciljano liječenje PE.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Nije utvrđena statistički značajna razlika u imunohistokemijskom izražaju EGFR-a u DS-u, VTB-u i EVTB-u među posteljicama iz trudnoća s PE i posteljicama kontrolne skupine.

2. Nije utvrđena statistički značajna razlika u imunohistokemijskom izražaju EGF-a u DS-u, VTB-u i EVTB-u među posteljicama iz trudnoća s PE i posteljicama kontrolne skupine.

3. HIF-1α imao je statistički značajno viši imunohistokemijski izražaj u DS-u, VTB-u i EVTB-u u posteljicama iz trudnoća s PE u usporedbi s posteljicama iz kontrolne skupine. Imunohistokemijski izražaj transkripcijskog faktora HIF-1α bio je najintenzivniji u EVTB-u u odnosu na VTB i DS kako u posteljicama s PE tako u posteljicama kontrolne skupine.

4. Proliferacijski indeks značajno je viši u skupini posteljica opterećenih PE, i to u DS-u i u EVTB-u u usporedbi s posteljicama kontrolne skupine.

## 7. SAŽETAK

Cilj: Istražiti imunohistokemijski izražaj faktora rasta EGF-a, EGFR-a, transkripcijskog faktora HIF-1α u VTB-u, EVTB-u i DS-u terminskih posteljica iz trudnoća s PE-om i terminskih posteljica urednih trudnoća te rezultate međusobno usporediti. Istražiti proliferacijski indeks u VTB-u, EVTB-u i u DS-u terminskih posteljica s PE i usporediti sa zdravom kontrolom.

Materijali i metode: Ispitivanu skupinu čini 29 posteljica jednoplodnih trudnoća trećeg tromjesječja kompliciranih PE i 19 terminskih posteljica iz urednih trudnoća kao kontrolna skupina. Klinička dijagnoza PE postavljena je na temelju strogih kriterija za arterijsku hipertenziju u prethodno normotenzivnih žena i proteinurije. Kriteriji isključenja obuhvaćali su prethodno postojanje arterijske hipertenzije, bolesti bubrega te vaskularne bolesti i dijagnosticiran HELLP sindrom. Izražaj EGF-a, EGFR-a i HIF-1α određivan je imunohistokemijskom metodom upotrebom specifičnih protutijela. Proliferacijska aktivnost određivana je zasebno za DS, EVT i EVTB koristeći antigen Ki-67. Imunohistokemijsko bojanje protutijelom CK7 omogućilo je razlikovanje DS-a od EVTB-a.

Rezultati: Nije pronađena statistički značajna razlika u imunohistokemijskom izražaju EGF-a i EGFR-a između terminskih posteljica s PE i terminskih urednih posteljica kontrolne skupine. Imunohistokemijski izražaj HIF-1α statistički je značajno viši kod terminskih posteljica s PE u odnosu na uredne terminske posteljice kontrolne skupine. Proliferacijski indeks znatno je viši u DS-u i EVTB-u kod posteljica iz trudnoća s PE u usporedbi s urednim terminskim posteljicama kontrolne skupine. Iako je proliferacijski indeks bio viši u DS-u u odnosu na EVTB kod obje skupine, ta se razlika nije pokazala statistički značajnom.

Zaključak: Imunohistokemijski izražaj faktora rasta EGF-a i receptora za EGF nije se razlikovao između posteljica sa PE i kontrolnih terminskih posteljica zbog mogućeg gubitka uloge ovog faktora rasta pred kraj trudnoće. Budući postoje četiri receptora te četrnaest liganda i barem tri signalna puta preko kojih navedeni ostvaruju svoje djelovanje, moguće je da baš drugi ligandi poput HB-EGF-a više utječu na pojavnost PE u terminskim posteljicama.

Imunohistokemijski izražaj transkripcijskog faktora rasta HIF-1α pokazao se višim u svim segmentima posteljica s PE u odnosu na posteljice kontrolne skupine. Ispitujući imunohistokemijski izražaj HIF-1α faktora u DS-u, dokazali smo da i majčin dio posteljice iskazuje isti odgovor na hipoksiju kao i fetalni. Kako i upalni citokini, autoantitijela koja su povišena u PE, mogu neovisno o hipoksiji dovoditi do povišenog izražaja HIF-1α, u

obrazloženju rezultata studije treba razmišljati i o navedenim parakrinim utjecajima. Rana ubrzana proliferacija DS-a i EVTB-a nužna je za pravilan rast i razvoj posteljice. Gotovo tri puta viši proliferacijski indeks u DS-u i EVTB-u posteljica s PE u odnosu na kontrolne terminske posteljice moguće predstavlja kompenzatorni mehanizam, kao posljedicu neadekvatne proliferacije i diferencijacije u ranim stadijima trudnoće.

## 8. SUMMARY

Purpose: To examine the immunohistochemical expression of the EGF growth factor, the transcription factor of HIF-1α in the VTB, EVTB and DS of term placentae from PE pregnancies and term placentae from orderly pregnancies, and to compare the results. To examine the proliferation index in the VTB, EVTB and DS of PE term placentae and to compare them to a healthy control group.

Materials and methods: The examined group consists of 29 placentae from third trimester singleton pregnancies with a complicated PE and 19 term placentae from orderly pregnancies as a control group. The PE clinical diagnosis was set based on strict criteria for arterial hypertension in previously normotensive women and proteinuria. The exclusion criteria included the prior existence of arterial hypertension, kidney disease, as well as vascular disease and a diagnosed HELLP syndrome. The EGF, EGFR and HIF-1α expression was determined by the immunohistochemical method through the usage of specific antibodies. The proliferation activity was determined separately for DS, EVT and EVTB through the use of the Ki-67 antigen. The immunohistochemical staining with the CK7 antibody enabled the differentiation between DS and EVTB.

Results: No statistically significant difference in the immunohistochemical expression of the EGF and EGFR was found between the PE term placentae and orderly term placentae of the control group. The HIF-1α immunohistochemical expression is statistically significantly higher in PE term placentae in relation to the orderly term placentae of the control group. The proliferation index is significantly higher in DS and EVTB in placentae from PE pregnancies in relation to the orderly term placentae of the control group. Although the proliferation index was higher in DS in relation to EVTB in both groups, that difference did not prove to be statistically significant.

Conclusion: The immunohistochemical expression of the EGF growth factor and the EGF receptor did not differ between the PE placentae and the control term placentae due to the possible loss of role of this growth factor towards the end of the pregnancy. Because there are four receptors and fourteen ligands, and at least three signal pathways through which the aforementioned perform their activity, it is possible that precisely other ligands, such as HBEGF, affect the incidence of PE in term placentae more.

The immunohistochemical expression of the HIF-1α transcription growth factor was higher in all segments of the PE placentae compared to the control group placentae. By examining the immunohistochemical expression of the HIF-1α factor in DS, we have proven that the mother's portion of the placenta exhibits the same response to hypoxia as the fetal does. As the inflammatory cytokines, antibodies that are high in PE can lead to a higher expression of HIF-1α independently from hypoxia, the explanation of the study results has to take into consideration the listed paracrine influences as well. An early accelerated proliferation of DS and EVTB is necessary for the proper growth and development of the placenta. The nearly triple proliferation index in DS and EVTB of PE placentae in relation to the control term placentae might represent a compensatory mechanism as a consequence of inadequate proliferation and differentiation in the early stages of the pregnancy.

## 9. LITERATURA


1. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. Lancet 2010;376:631-644.

2. Sibai BM. Diagnosis and menagement of gestational hypertension and preeclampsia. Obstet Gynecol 2003;102:181-192.

3. Sibai BM, Delaker G, Kupferminic M. Pre-eclampsia. Lancet 2005;365:785-799.

4. Ness RB, Roberts JM. Heterogenous couses constituting the single sindrom of preeclampsia: a hypothesis and its implications. Am J Obstet Gynecol 1996;175:1365-1370.

5. Kanasaki K, Kalluri R. The biology of Pre-eclampsia. Kidney Int 2009;76:831-837.

6. Spradley FT, Palei AC, Granger JP. Increased risk for the development of preeclampsia in obese pregnancies: weighing in on the mechanisms. Am J Physiol Integr Comp Physiol. 2015;309:1326-1343.

7. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding Preeclampsia. Science 2005;308:1592-1594.

8. Huppertz B. Placental origins of Preeclampsia: Challenging the Curvent Hypothesis. Hypertension 2008;51:970-975.

9. Redman CW, Sargent IL, Staff AC. IFPA Senior Award Lecture: making sense of pre-eclampsia – Two placental causes of pre-eclampsia? Placenta 2014;35:20-25.

10. Burton GJ, Jauniaux E. Oxydative stress. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2011;25:287-299.

11. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J at al. Onste of maternal arteriae blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. Am J Pathol 2000;157:2111-2122.

12. Gauster M, Moser G, Orendi K, Huppertz B. Factors Involved in Regulating Trophoblast Fusion: Potential Role in the Development of Preeclampsia. Placenta 2009;23:49-54.

13. Fischer SJ. Why is placentation abnormal in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 2015;46:115-122.

14. Redman CW, MChir M, Staff AC. Preeclampsia, biomarkers, syncitiotrophoblast stress and placental capacity. Am J Obstet Gynecol 2015;28:9-11.

15. Karumanchi SA, Granger JP. Preeclampsia and Pregnancy – Related Hypertensive Disorders Hypertension 2016;67:238-242.

16. Jensen RB, Chellakooty M, Vielwerth S, Vaag A, Larsen T, Greigsen G. Intrauterine growth retardation and consequences for endocrine and cardiovascular diseases in adult life: does insulin like growth factor I play a role? Horm Res 2003,60:146-148.

17. American College of Obstetricians and Gynecologists, Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists Task Force on Hypertension in Pregnancy. Obstet Gynecol 2013;122:1122-1131.

18. Valenzuela FJ, Perez-Sepulveda A, Torres MJ, Carrea P, Repetto GM, Illanes SE. Pathogenesis of Preeclampsia. The Genetic Component J. Pregnancy 2021;2012:1-8.

19. Pare E, Parry S, McElrath TF, Pucci D, Newton A, Lim K. Clinical Risk Factors for Preeclampsia in the 21th Century. Obstet Gynecol 2014;124:763-770.

20. Kos M, Leniček T. Osnove patologije posteljice. Medicinska naklada, Zagreb 2011.

21. Grbeša Đ. Rani razvoj placente. U: Kurjak A i sur. Ginekologija i perinatologija II. Varaždinske Toplice, Tonimir 2003.

22. Conrad KP, Rabaglino MB, Viterweer ED. Emerging Role for Dysregulated Decidualisation in the Genesis of Preeclampsia. Placenta 2017;60:119-129.

23. Burton GJ, Jauniaux E, Murray AJ. Oxygen and placental development: parallels and differences with tumour biology. Placenta 2017;56:14-18.

24. Moser G, Huppertz B. Implantation and extravillous trophoblast invasion: Fromrare archival specimens to modern biobanking. Placenta 2017;56:19-26.

25. Fox H. Sebire NJ. Physiology of the placenta. U: Fox H i sur. Pathology of the placenta III izd.Philadelphia: Saunders 2007:57-69.

26. Benirschke K. Microscopic survey. U: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen RN i sur. Pathology of the human placenta V izd. New York: Springer Science Business Media 2006:16-30.

27. Elliot MG. Oxidative stress and the evolutionary origins of preeclampsia. J Reprod Imunoll 2016;114:75-80.

28. Gauser M, Huppertz B. Fusion of cytotrophoblast with syncyciotrophoblast in the human placenta: factors involved in syncytialization. J Reprod Med Endocrinol 2008;512:76-82.

29. Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. Human early placental development: potential roles of endometrial glands. Placenta 2007;28:64- 69.

30. Sharp AN, Heazell AE, Crocker IP, Mor G. Placental apoptosis in health and disease. AM J Reprod Immunol 2010;64:159-169.

31. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature 2000;407:770-776.

32. Burton GJ, Jones CJ. Syncytial knots, sprouts, apoptosis and trophoblast deportation from the human placenta. Taiwan J Obstet Gynecol 2009;48:28-37.

33. Benian A, Uzun H, Aydin S, Albayrak M, Uludrag S, Madazli R. Placental stem cell markers in preeclampsia. Int J Gynaecol Obstet 2008;100:228-233.

34.Rredman CW, Sargent IL. Placental stress and preeclampsia: a revised view. Placenta 2009;30:33-42.

35. Hung TH, Skepper JN, Charnock-Jones S, Burton GJ. Hypoxia- reoxygenation: A potent Inducer of Apoptotic changes in the Human Placenta and Possible Etiological factor in Preeclampsia. Circ Ress 2002;90:1274-1281.

36. Bilodeau JF. Review: Maternal and placental antioxidant response to preeclampsia – impact of vasoactive eikosanoids. Placenta 2014;35:32-38.

37. Leung DN, Smith SC, To KF, Sahota DS,Baker PN. Increased placental apoptosis in pregnancies complicated by preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 2001;184:1249-1250.

38. Orozco AF, Bischoff FZ, Horne C, Popek E, Simpson JL, Lewis DE. Hypoxia-induced membrane baund apoptotic DNA particles: potential mehanism of fetal DNA in maternal plasma. Am NY Acad SCI 2006;1075:57-62

39. Redman CW, Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Southcombe JH, Collett GP, et al. Review: Does size matter? Placental debris and the patophisiology of preeclampsia. Placenta 2012;33:48-54.

40. Li RH, Zunang LZ. The effects of growth factors on human normal placental cytotrophoblast cell proliferation. Human Reprod 1997;12:830-834.

41. Akbalik ME, Ketani MA. Expression of epidermal growth factor receptors and epidermal growth factor amphiregulin and neuregulin in bovine uteroplacental tissues during gestation. Placenta 2013;34:1232-1242.

42. Wen HY, Abassi S, Kellems RE, Xia Y. m-Tor: a placental growth signaling sensor. Placenta 2005;26:63-69.

43. MiyazavaK. Role of epidermal growth factor in obstetric and gynecology. Placenta 1992;79:1033-1038.

44. Maruo T, Matsuo H, Murata K, Mochizuki M. Gestational Age- Dependent Dual Action of Epidermal Growth Factor on Human Placenta Early in gestation. J Clin Endocrinol Matab 1992;76:1362-1367.

45. Maruo T, Matsuo H, Otani T, Machizuki M. Role of Epidermal Growth Factor and its Receptor in the Development of the Human Placenta. Reprod Fertil Dev 1995;7:1465-1470.

46. Perkins J, St John J, Ahmed A. Modulation on Trophoblast Cell death by Oxygen and Epidermal Growth Factor. Molec Med 2002,8:847-856.

47. Forbes K, Westwood M. Maternal growth factor regulation on human placental development and fetal growth. Journ of Endocrin 2010;207:1-10.

48. Foundacci C, Alsat E, Gabriel R, Blot PH, Nessmann C, Evain- Brion D. Alterations of Human Placental Epidermal Growth Factor Receptor in Intrauterine Growth Retardation. J Clin Invest 1994;93:1149-1155.

49. Wright JK, Dunk CE, Amsalem H, Maxwell C, Keating S, Lye SJ. HER 1 Signaling Mediates Extravillous Trophoblast Differentiation in Humans. Biol of reprod 2010;83:1036-1045.

50. Milchev N, Batashki I, Staribratova D, ZaprianovZ. Trophoblast expression of epidermal growth factor in the preeclampsia. Akush Ginecol Sofiia 2006;45:21-24.

51. Ferrandina G, Lanzone A, Scambia G, Caruso A, Panici P, Mancuso S. Epidermal growth factor receptor in placenta and fetal mambranes from hypertension- complicated pregnancies. Human reprod 1995;10:1845-1849.

52. Dong M, Wang Z, Chen X. Placental expression of epidermal growth factor receptor in pregnancy induced hypertension. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 2001;36:336-337.

53. Iriyama T, Wang W, Parchim NF, Song A, Blackwell SC, Sibai BM et all. Hypoxia-Independent Upregulation of Placental Hypoxia Inducible Factor-1α Gene Expression Contributes to the Pathogenesis of Preeclampsia. Hypertension 2015;65:1307-1315.

54. Albers RE, Kaufman MR, Natale BV, Keoni C, Kulkarni- Datar K, Min S et all. Trophoblast- Specific Exprwssion of Hif 1-α Result in Preeclampsia- Like Symptoms and Fetal Growth Restriction. Sci Rep 2019;9:1-13.

55. Semenza GL. Regulation of tissue perfusion in mammals by hypoxia- inducible factor 1α. Exp Physiol 2007;92:998-991.

56. Semenza GL. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia- Inducible Factor 1α . Physiol 2008;24:97-106.

57. Nangaku M, Eckardt KU. Hypoxia and HIF system in kidney disease. J Mol Med 2007;85:1325-1330.

58. Letta F, Wu Y, Winter J, Xu J, Wang J, Post M, Caniggia I. Dynamic HIF 1α Regulation During Human Placental Development. Biol of Reprod 2006;75:112-121.

59. Tal R. The Role of Hypoxia and Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha in Preeclampsia Pathogenesis. Biol of reprod 2012;87:1-8.

60. Rath G, Aggarwal R, Jawanjal P, Tripathi R, Batra A. HIF 1 Alpha and Placental Growth factor in Pregnancies Complicated With Preeclampsia: A Qualitative and Quantitative Analysis. Jour of Clinic Lab Analysis 2016;30:75-85.

61. Caniggia I, Winter JL. Adriana and Luisa Castellucci Award 2001. Hypoxia- inducible factor 1: Oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and preeclamptic pregnancies- a review. Placenta 2002;23:47-57.

62. Rajakumar A, Conrad KP. Expression, ontogeny and regulation of hypoxia- inducible transcription factors in the human placenta. Biol Reprod 2000;63:559-569.

63. Levine RJ, Maynard SE, Qian C,et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. N Engl J Med 2004;350:672-683.

64. Tannetta D, Masliukaite I, Vatish M, Redman C, Sargent I. Update of syncytitiotrophoblast derived extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. J Reprod Immunol 2017;119:98-106.

65. Powe EC,Levine JR, Karumanchi A. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of anti- angiogenic factors and implications for later CVD. Circulation 2011;21:123-134.

66. Amaval L, Cunningham M, Cornelius D, LaMarca B. Preeclampsia: long- term consequences for vascular helth. Vascular Helth and Risk Menagement 2015;11:403-415.

67. Shots MH, Gordijin JS, Scherjon AS, Van Goor H, Hillebrands JL. Oxidative stress in placental pathology. Placenta 2018;03:1-9.

68. Langhlin Mc, Baczyk D, Potts A, Hladunewich M, Parker JD, Kingdom JC. Low molecular weight heparin improve endothelial function in pregnant women at high risk of preeclampsia. Hypertension 2016;69:180-188.

69. Bolnick AD, Bolnick JM, Kilburn AB, Pasalodos OJ, Singhal KP, Dai J, Diamond PM, Armant R, drewlo S. Enhancement of trophoblast differentiation and survival by low molecular weight heparin requires HbEGF- like growth factor. Human Reprod 2017;32:1218-1219.

70. Quaranta M, Erez O, Mastrolia SA, Koifman A, Leron E, Eshkoli T, Mazor M, Holcberg G. The physiologic and therapeutic role of heparin in implantation and placentation. Peer J 2015;691:1-14.

## 10. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime**: Indira Kosović

**Adresa**: Klinika za ženske bolesti i porode, KBC Split

Spinčićeva 1, 21000 Split

e-mail: ikosovic@gmail.com

**Rođena**: 27. siječnja 1966.

**Državljanstvo**: hrvatsko

**Nacionalnost**: Hrvatica

**Obitelj**: udana, majka jednog djeteta

**Obrazovanje**:

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu – Studij u Splitu (1989.)

Položen stručni ispit (1992.)

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

Subspecijalistički ispit iz uže specijalnosti fetalne medicine i opstetricije – KBC Zagreb (2009.)

**Zaposlenje**:

Pripravnički staž DZ Makarska (1990. – 1992.)

DZ Makarska, radno mjesto: liječnik opće medicine (1990. – 2009.)

Poliklinika Analiza, Dugopolje, specijalist ginekologije i porodništva (2010.)

Poliklinika Gynenova, Split, specijalist ginekologije i porodništva (2011.)

Klinika za ženske bolesti i porode, KBC Split, specijalist ginekologije, uži specijalist fetalne medicine i opstetricije (2012. – danas)

**Trenutno radno mjesto:**

Liječnik, specijalist ginekolog, uže specijalnosti fetalne medicine i opstetricije, Zavoda za perinatologiju, Klinike za ženske bolesti i porode, KBC Split

**Poslijediplomski studij**:

Poslijediplomski doktorski studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu, smjer „Klinička medicina“ (2005.)

Poslijediplomski doktorski studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu, smjer

„Biologija novotvorina“ (2012.)

**Znanstveno napredovanje**: Izbor u suradničko zvanje asistenta na Katedri za ginekologiju i porodništvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (2012.)

**Organizacija znanstvenih i stručnih skupova**:

XXV. Perinatalni dani „ Ante Dražančić“ Split 2010.

**Tečajevi i trajne edukacije liječnika**:

Predavač:

Rodilište – prijatelj djece (tečaj trajne edukacije – 2009)

Tečajevi prve kategorije:

Dijabetes i trudnoća, Zagreb (2002.)

Kolposkopija, Split (2003.)

UZV dijagnostika, Zagreb (2005.)

Dijagnostika, liječenje i prognoza preinvazivnih i ranih invazivnih neoplazija vulve, vagine i cerviksa, KBC Zagreb (2005.)

Kolposkopija, Zagreb (2006.)

Hitna stanja u ginekologiji i porodništvu, Zagreb (2006.)

**Sudjelovanje u nastavi**:

Diplomska nastava: asistentica na Katedri za ginekologiju i porodništvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (od 2012.)

Predavačica na Sveučilišnom odjelu zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu (od 2014.)

**Publiciranje**:

**Radovi objavljeni u CC indeksiranim časopisima**:

1. Kosovic I, Kuzmic Prusac I, Berkovic A, Marusic J, Mimica M, Zekic Tomas S. Expression of EGF, EGFR, and proliferation in placentas from pregnancies complicated with preeclampsia. Hypertension in Pregnancy 2017;36:16-20

2. Mestrovic Z, Roje D, Relja A, Kosovic I, Aračić N, Vulić M, Polašek O. Maternal body mass indeks change as a new optimal gestational weight gain predictor in overweight women. Croat Med J 2019;60:508-14

3. Kosovic I, Kuzmic Prusac I, Mestrovic Z, Berkovic A, Marusic J, Zekic Tomas S. HIF-1α immunohistochemical expression in decidual cells, villous and extravillous trophoblast in placentas from pregnancies complicated with preeclampsia. Pregnancy Hypertension 2020;21:176-178.

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

1. Karelovic D,Tadin I, Strinic T, Vidovic-Filipovic S, Vrdoljak E, Kosovic I, Marusic J, Benzon Z, Mestrovic Z, Branica D. Rak endometrija u Klinici za ženske bolesti i porode KB Split. Gynaecol Perinatol 2004;13(suppl.2):123-128.

2. Dagelic A, Roje D, Radman M, Mestrovic Z, Kosovic I, Aracic N. Pregnancy and delivery with gestational diabetes mellitus in University hospital Split. Gynaecol Perinatol 2016;25(3):91-6.

3. Marušić J, Šprem Goldštajn M, Roje D, Kosović I, Rešić Karara J. Premature ovarian insufficiency. Gynaecol Perinatol 2018;27(3-4):47-52.

**Članstvo i aktivnosti u stručnim organizacijama**:

Hrvatski liječnički zbor

Hrvatsko društvo ginekologa i opstetričara

Hrvatsko društvo za perinatalnu medicinu

**Strani jezik**:

Engleski jezik (aktivno pišem, čitam i govorim)