T regulacijski limfociti i prirodnoubojičke stanice u vilitisu nepoznate etiologije posteljica iz trudnoća kompliciranih preeklampsijom

Benzon, Sandra

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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:171:986525

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

SANDRA BENZON

T REGULACIJSKI LIMFOCITI I PRIRODNOUBOJIČKE STANICE U VILITISU NEPOZNATE ETIOLOGIJE POSTELJICA IZ TRUDNOĆA KOMPLICIRANIH PREEKLAMPSIJOM

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2018.

Mentor: prof. dr. sc. Ivana Kuzmić Prusac

ZAHVALE

Hvala mentorici prof. dr. sc. Ivani Kuzmić Prusac, a posebno dr. sc. Sandri Zekić Tomaš na savjetima i velikoj, nesebičnoj, prijateljskoj podršci.

Doktorsku disertaciju posvećujem svojoj majci Cviti koja je sve žrtvovala za moje školovanje, te svojoj djeci, Antei i Mislavu.

SADRŽAJ

1 UVOD ... 2
1.1 POSTELJICA ... 2
1.1.1 Razvoj, građa i funkcija posteljice ... 2
1.2 VILITIS NEPOZNATE ETIOLOGIJE ... 6
1.2.1 Stanični upalni infiltrat u vilitisu ... 8
1.3 PREEKLAMPSIJA ... 10
1.4 T REGULACIJSKI LIMFOCITI I PRIRODNOUBOJIČKE STANICE ... 11
1.4.1 T regulacijski limfociti u normalnoj trudnoći i preeklampsiji ... 11
1.4.2 Prirodnoubojičke stanice u normalnoj trudnoći i preeklampsiji ... 12
2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE ... 13
3 MATERIJALI I METODE ISTAŽIVANJA ... 14
3.1 MATERIJAL ... 14
3.2 METODE ISTRAŽIVANJA ... 15
3.2.1 Patohistološki pregled posteljice ... 15
3.2.2 Imunohistokemijska metoda ... 15
3.2.3 Statističke metode ... 19
4 REZULTATI ... 21
4.1 Demografska obilježja ispitivanih skupina ... 21
4.2 Demografska obilježja ispitivanih skupina i kontrolne skupine ... 22
4.3 Obilježja VUE ispitivanih posteljica ... 23
4.4 Vrsta i broj staničnog upalnog infiltrata i T regulacijskih limfocita u žarištima VUE i njihova usporedba između ispitivanih skupina ... 24
4.5 Odnos CD4+ i CD8+ staničnog upalnog infiltrate u žarištima VUE između ispitivanih skupina ... 26
4.6 Odnos T regulacijskih limfocita i prirodnoubojičkih stanica u decidui ispitivanih skupina i kontrolne skupine ... 28
5 RASPRAVA ... 30
6 ZAKLJUČCI ... 35
7 SAŽETAK ... 36
8 SUMMARY ... 38
9 LITERATURA ... 40
10 ŽIVOTOPIS ... 45

POPIS KRATICA

CD - diferencirajući biljeg limfocita

CTB - citotrofoblast

GVHD - reakcija presatka protiv primaoca

HE - hemalaun-eozin

HVG - rekcija primaoca protiv presatka

IHK - imunohistokemija

IL - interleukin

INF-γ - interferon-gama

IUZR - intrauterini zastoj u rastu

MSC - mezenhimalne matične stanice

NK - prirodnoubojičke stanice

PE - preeklampsija

PPROM - predterminsko prijevremeno prsnuće plodovih ovoja

SČ - sincicijalni čvorići

STB - sinciciotrofoblast

TB - trofoblast

TNF-β - tumor nekrotizirajući čimbenik beta

TGF-β - čimbenik rasta tumora beta

T reg - T regulacijski limfociti

VUE - vilitis nepoznate etiologije

1 UVOD

1.1 POSTELJICA

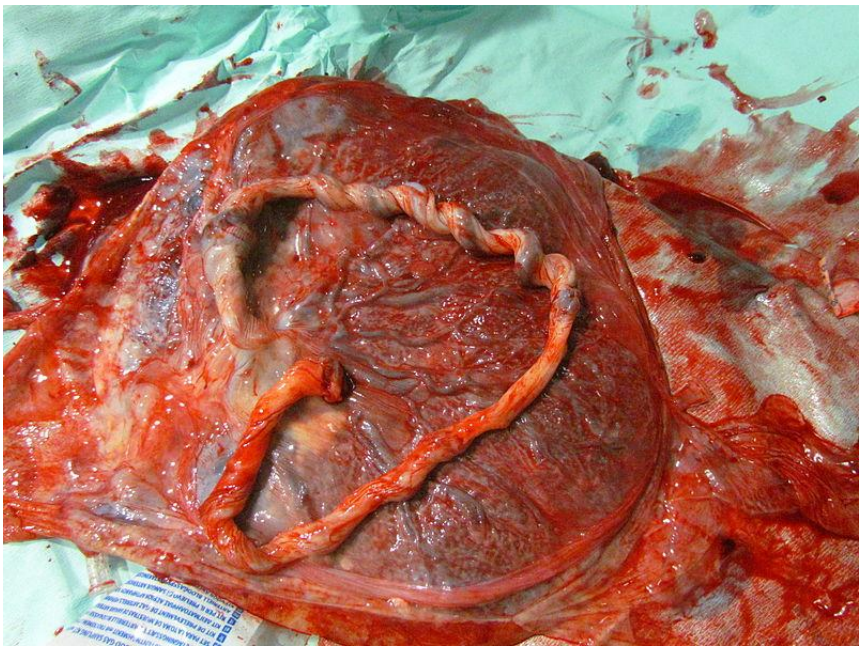
1.1.1 Razvoj, građa i funkcija posteljice

Posteljica je organ vezan za trudnoću koji dijeli, a ujedno i povezuje dva genetski različita organizma. Nastanak posteljice je kompliciran proces koji započinje oplodnjom jajne stanice i daljnjim dijeljenjem zametka te stvaranjem blastociste petog dana nakon oplodnje. Blastocistu izvana oblaže trofoblast (TB) iz kojeg će kasnije nastati posteljica, a unutrašnjost ispunjava embrioblast iz kojeg nastaju plod i pupkovina (1).

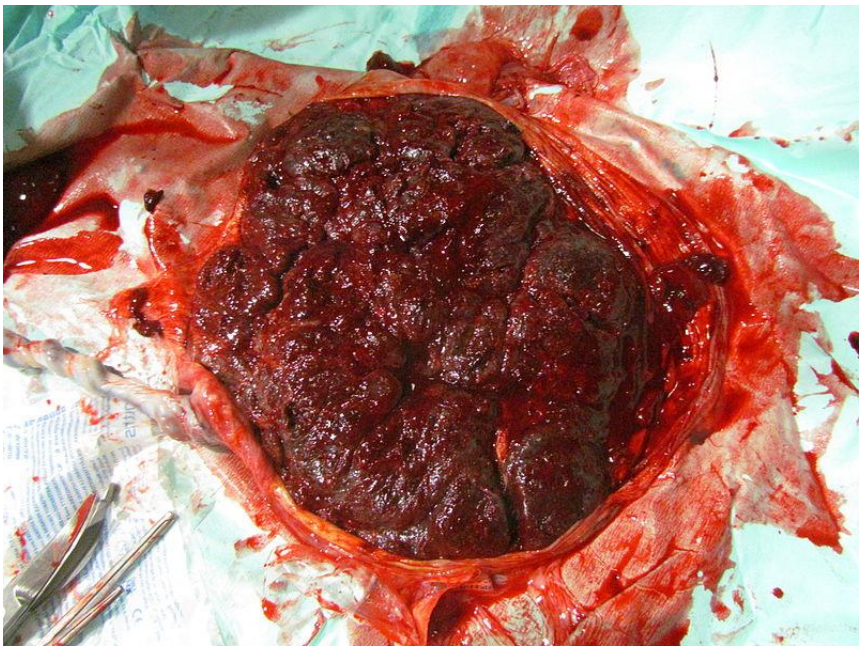
Zrela terminska posteljica makroskopski pokazuje široki raspon u obliku, veličini i masi. Na njoj razlikujemo: korionsku ploču koja je fetalna strana posteljice (Slika 1.) i bazalnu ploču koja je maternalna strana posteljice (Slika 2.). Fetalna strana ili korionska ploča normalno je sjajna, plavkasta i okrenuta prema fetusu. Njen najpovršniji sloj je amnij kroz koji su vidljive velike krvne žile i to arterije i vene koje se mogu razlikovati po tome što se arterije pružaju površnije od vena, odnosno iznad njih. Ispod amnijskog nalazi se korionski sloj. Maternalna površina ili bazalna ploča je građena od bazalne decidue za koju se hvataju posteljične tzv. sidrene resice. Podijeljena je u 10-40 kotiledona koje odvajaju pregrade ili septa. Pregrade su nabori decidue koji se pružaju od bazalne decidue prema nadležećem posteljičnom tkivu. Bazu im čini decidua, a građeni su od stanica ekstraviloznog TB. Pregrade međusobno odvajaju kotiledone, ali nikad ne dopiru do korionske ploče tako da majčina krv slobodno teče iz jednog kotiledona u drugi, te je to ujedno i mjesto izmjene tvari između majke i ploda (Slika 3.)(2). Posteljično stablo nastaje grananjem mezenhimskih resica prema nezrelim, zrelim, matičnim, intermedijarnim resicama i terminalnim resicama. Terminalne resice su krajnji ogranci posteljičnih resica koje predstavljaju osnovnu funkcionalnu jedinicu posteljice i preko kojih se izmjenjuju tvari između majke i ploda u trećem tromjesečju trudnoće. Sačinjavaju oko 50 % volumena posteljičnog stabla (3). Terminalnu resicu tvori oskudna vezivna stroma i sinusoidalne kapilare koje se nalaze neposredno ispod tankog pokrovnog TB stvarajući sinciciokapilarnu (uteroplacentalnu) membranu. Sinciciokapilarne membrane predstavljaju mjesta dilatiranih fetalnih kapilara s izrazito stanjenim ili u potpunosti nestalim TB na površini.Na taj se način izmjena kisika i hranjivih tvari između majčine krvi, koja se nalazi u inetrviloznim prostorima i fetalne krvi u kapilarama resica olakšava i ubrzava (4)(Slika 4.). Trofoblast koji pokriva resice naziva se vilozni TB, a sastoji se od unutrašnjeg

sloja citotrofoblasta (CTB) i vanjskog sloja sinciciotrofoblasta (STB). Postoji i tzv. intermedijarni ili ekstravilozni TB koji aktivno urasta u deciduu i čiji je zadatak pretvorba spiralnih arterija maternice u uteroplacentarne krvne žile (2). Na samim vrhovima terminalnih resica nalazimo sincicijalne čvoriće (SČ) građene od više jezgara unutar jedinstvene citoplazme koji se postupno otpuštaju u majčinu cirkulaciju i bivaju uklonjeni od strane plućnih makrofaga (5).

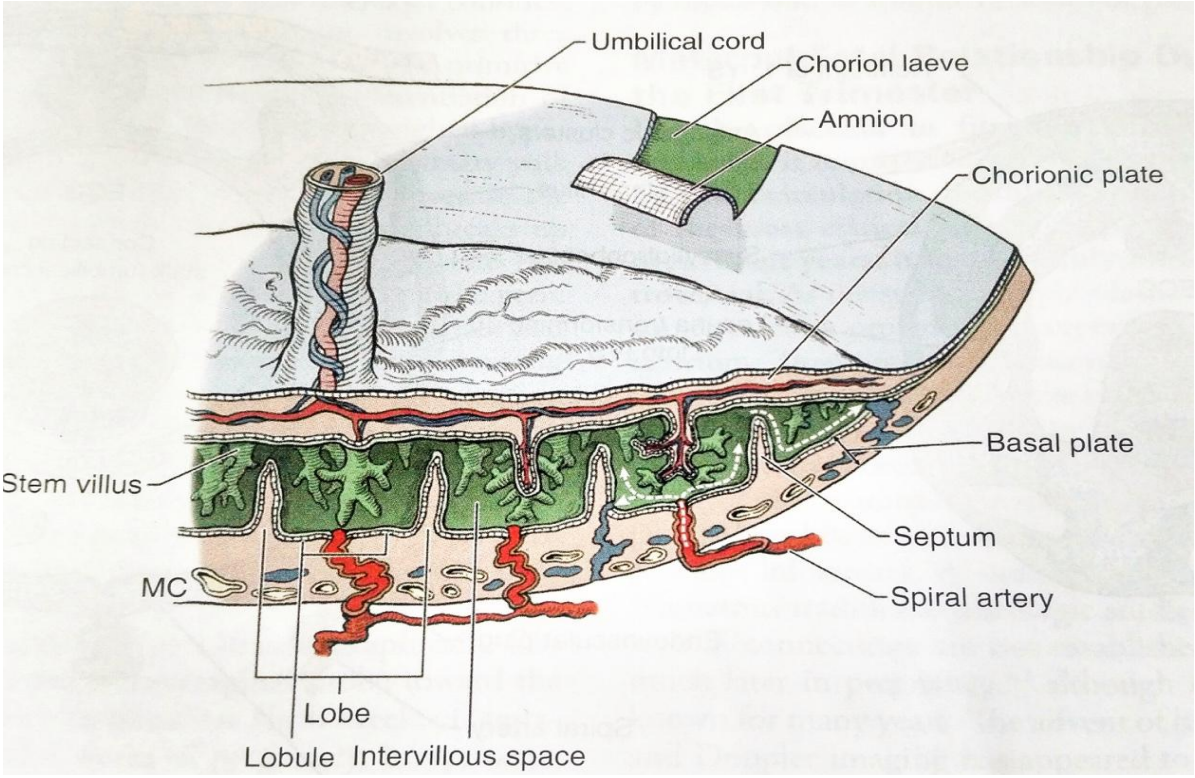
Posteljica obavlja brojne funkcije. Nutritivno-respiratorna funkcija omogućuje izmjenu svih potrebnih hranjivih sastojaka i kisika između majke i ploda. Metabolička funkcija omogućuje prijelaz metaboliziranih produkata i ugljičnog dioksida iz krvotoka fetusa u krvotok majke. Endokrinološka funkcija omogućuje vrlo rano izlučivanje humanog korionskog gonadotropina, a nešto kasnije i spolnih hormona, u prvom redu estrogena i progesterona koji su zajedno s hormonima jajnika važni za održavanje trudnoće. Protektivna funkcija spriječava prodor većine mikroorganizama iz majke u plod te niz drugih funkcija koje su važne za rast i razvoj fetusa (4).



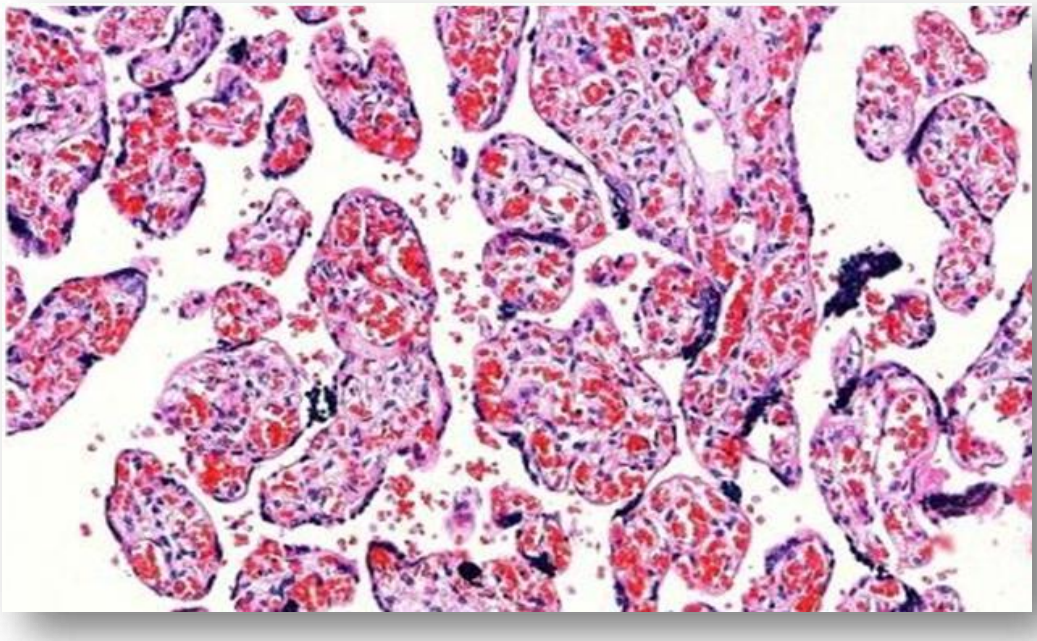
Slika 1. Makroskopski prikaz fetalne strane terminske posteljice iz uredne trudnoće



Slika 2. Makroskopski prikaz maternalne strane terminske posteljice iz uredne trudnoće



Slika 3. Shematski prikaz presjeka kroz zrelu posteljicu. Korionska ploča okrenuta prema fetusu, pokrivena plodovim ovojima i bazalna ploča građena od bazalne decidue za koju se hvataju posteljične resice koje su razgranate i okružene interviloznim prostorom ispunjenim majčinom krvlju. Preuzeto iz: *Gabbe et al. Placental anatomy and physiology. Obstetrics 2016;1:3.*

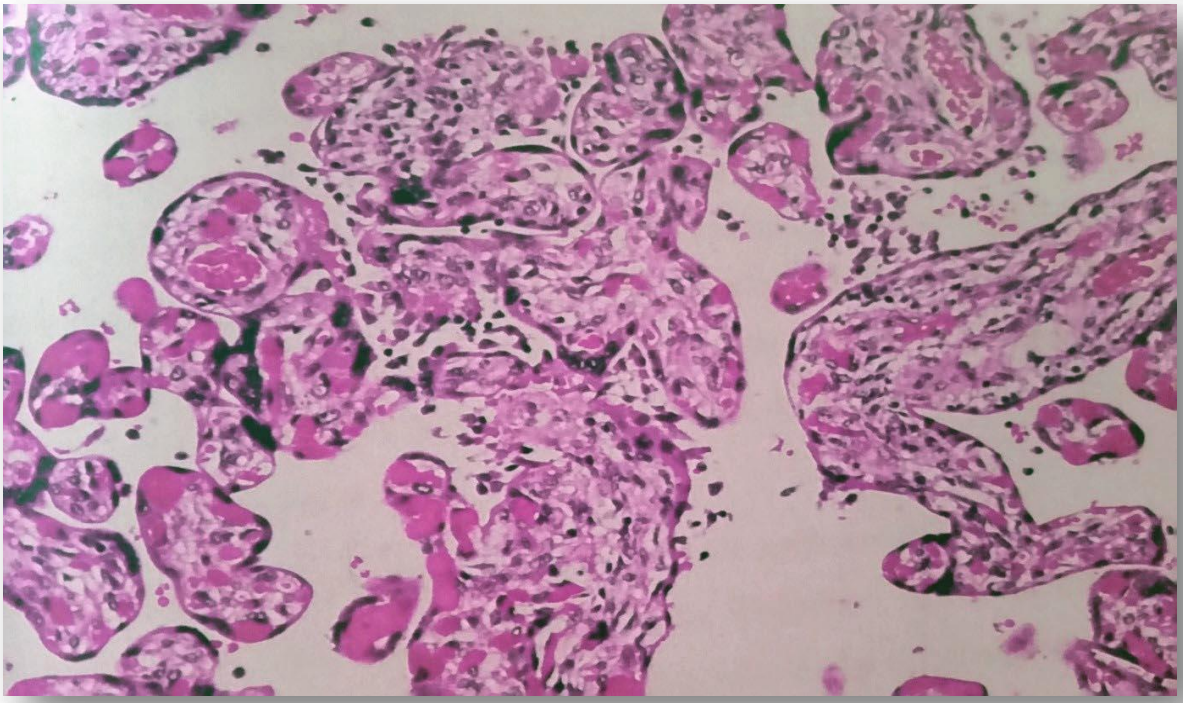


Slika 4. Mikroskopski prikaz posteljičnih resica terminske posteljice iz uredne trudnoće (HEx200)

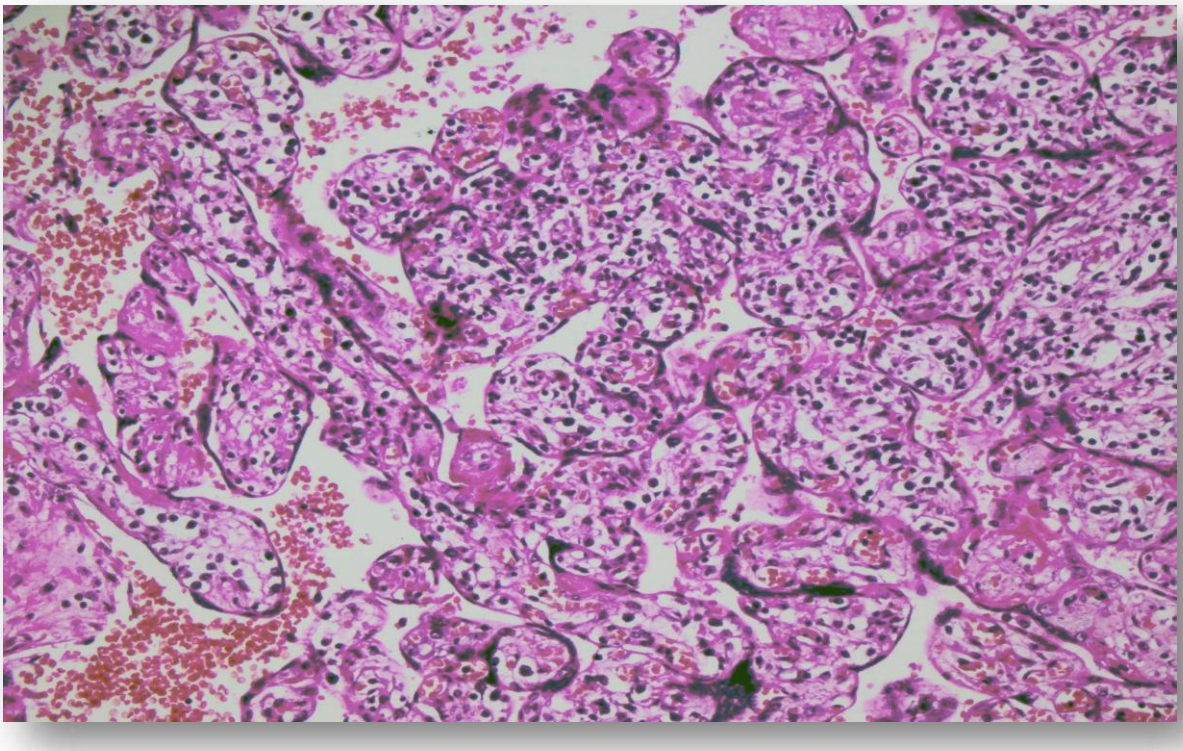
1.2. VILITIS NEPOZNATE ETIOLOGIJE

Vilitis nepoznate etiologije (VUE) je važan oblik oštećenja posteljice koji je karakteriziran upalnim infiltratom u stromi resica (6). Učestala je lezija koja pogađa 5-15% svih posteljica uglavnom trećeg tromjesečja (6). Promjena ne mora imati utjecaj na stanje fetusa, odnosno novorođenčeta, no najčešće je povezana s intrauterinim zastojem rasta, povećanom stopom perinatalnog mortaliteta, kao i sklonošću ponavljanja u slijedećim trudnoćama (7-10). Zahvaćenost parenhima posteljice je obično neuniformna, a nezahvaćeni dio je obično kompletno normalnog izgleda i funkcije. Prema Redlinu VUE se može definirati kao lezija niskog ili visokog stupnja ovisno o broju resica infiltriranih upalnim stanicama (6). Kada je zahvaćeno manje od 10 resica u jednom žarištu, fokalno ili u više žarišta, multifokalno, VUE je niskog stupnja (Slika 5.), a kada je zahvaćeno više od 10 resica u žarištu, ili difuzno, VUE je visokog stupnja (Slika 6.)(Tablica 1.)(6). Najvažnije razlike VUE od infekcioznog vilitisa su: odsutstvo znakova i simptoma infekcije u majke i djeteta, povećan udio limfocita te različita frekvencija pojavljivanja (1-4/1000 vilitisa upalnog porijekla u odnosu na 50-150/1000 VUE)(6). Redline je također predložio klasifikaciju vilitisa na distalni, proksimalni i bazalni s obzirom na resice koje zahvaća. Distalni je najčešći i uključuje terminalne i zrele intermedijarne resice. Proksimalni obuhvaća matične resice, uz koje ponekad i korionsku ploču. Bazalni tip vilitisa uključuje sidrene resice koje se hvataju za bazalnu ploču i obično je vezan za kronični deciduitis (6).

Priroda antigena je nepoznati aspekt ovog procesa. Mnoge su spekulacije da VUE predstavlja reakciju primaoca protiv presatka (HVG) analognu odbacivanju transplantata, ali isto tako VUE može predstavljati i majčin imuni odgovor na antigen u stromi resica (11).



Slika 5. Mikroskopski prikaz VUE niskog stupnja, zahvaćeno manje od 10 resica po fokusu (HEx200)



Slika 6. Mikroskopski prikaz VUE visokog stupnja, zahvaćeno više od 10 resica po fokusu (HEx200)

Tablica 1. Predložena klasifikacija vilitisa nepoznate etiologije prema Redlineu

Lokalizacija: Uglavnom bazalni nasuprot vilitisa s nebazalnom komponentom		
Proširenost: Niski stupanj (≤ 10 resica/ žarištu)	žarišni:	2-3 žarišta
	više žarišta:	>3 žarišta
Visoki stupanj (>10 resica/žarištu)	„patchy“: *	>1 žarišta
	difuzni	>5% svih resica
Udružene lezije: decidualne plazma stanice		
obilni fibrin oko resica		
obliterativna fetalna vaskulopatija		
aktivni intervilozitis		

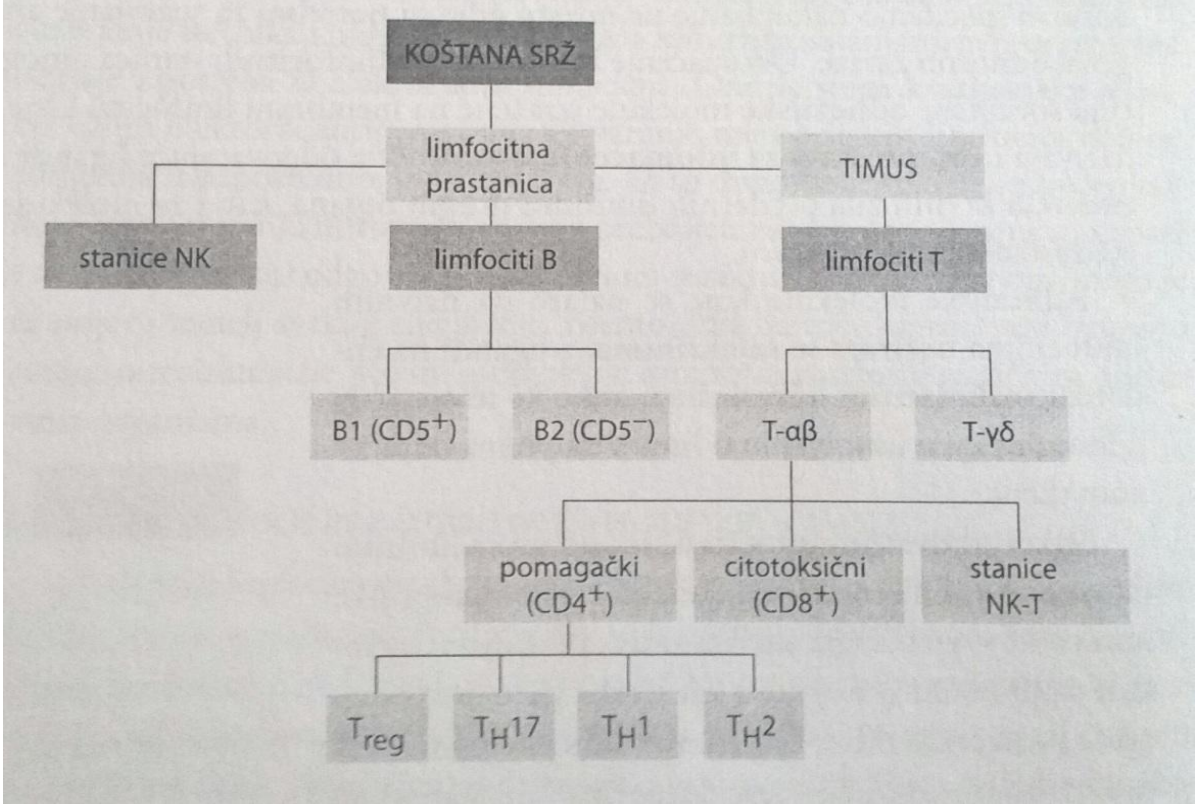
*nejednolično-točkasto

1.1.2 Stanični upalni infiltrat u vilitisu

Upalni infiltrat u žarištima VUE sastoji se uglavnom od fetalnih Hofbauerovih stanica (makrofaga) i majčinih CD8+ i CD4+ T limfocita. Do danas CD4+ i CD8+ T limfociti nisu dobro okarakterizirani u posteljici. Makrofazi koji su CD68 pozitivni i prisutni u posteljici tijekom cijele trudnoće ne izražavaju antigen specifične receptore nego nekoliko skupina receptora koji im pomažu da osjete „opasne“ tvari i da na njih reagiraju aktivacijom (11-13).

Limfociti su najvažnije stanice imunološkog sustava jer su nosioci svih vrsta imunosti, bilo urođene bilo stečene. Postoje tri osnovne populacije limfocita: limfociti T, B i prirodnoubojičke stanice ili NK stanice koje se razlikuju prema limfocitnim biljezima koji spadaju u skupinu leukocitnih diferencijacijskih antigena od kojih se većina svrstava u tzv. CD - klasifikaciju. Pored CD biljega limfociti izražavaju i receptore za antigene. Urođena imunost na brojne antigene postoji trajno u organizmu i prije dodira s njima. Čini prvu crtu obrane i od rođenja osigurava dobru zaštitu protiv većine mikroorganizama. Prirodnoubojičke NK stanice dio su urođene imunosti koje ne izražavaju specifični receptor za antigen, a vlastite stanice prepoznaju u vrlo kratkom vremenu te reguliraju upalni odgovor. Morfološki, većina stanica NK pripada skupini velikih granuliranih limfocita. Adaptivna ili stečena imunost javlja se ako antigen prođe prvu crtu obrane. Stanice adaptivne imunosti dijele se na pomagačke

limfocite T koji gotovo uvijek izražavaju na membrani koreceptor CD4 te citotoksične limfocite T koji izražavaju koreceptor CD8 (Slika7.)(14).



Slika 7. Shematski prikaz razvoja T limfocita. Preuzeto iz : *Andreis I et al. Stanice, tkiva i organi imunosnog sustava. Imunologija 2010;2:21-41.*

1.2 PREEKLAMPSIJA

Preeklampsija (PE) je poremećaj specifičan za trudnoću, karakteriziran pojavom hipertenzije (sistolički tlak >140 mm Hg i/ili dijastolički tlak >90 mm Hg u najmanje dva mjerenja u razmaku od 4 sata do jednog tjedna) udružene s proteinurijom (>300 mg u 24-h urinu , >1+) koji nastaje nakon 20. tjedna gestacije u prethodno normotenzivnih žena bez proteinurije. Vodeći je uzrok maternalnog i perinatalnog morbiditeta i mortaliteta i javlja se u 7-10% trudnoća (15). Uzrok nastanka PE je još uvijek nepoznat. Smatra se da je izazvan nesposobnošću ekstraviloznog TB da invadira decidualne arterije dovodeći do promjena u perfuziji posteljice i insuficijenciji dostave hranjivih tvari (16). Neki istraživači vjeruju da bi se slaba invazija TB mogla pripisati neodgovarajućem odgovoru majčinog imunološkog sustava na ekstravilozni TB (17). Novija istraživanja ukazuju na važnost uloge T regulacijskih (T reg) limfocita u imunoregulaciji i induciranju periferne tolerancije na trudnoću (18). Normalna ljudska trudnoća karakterizirana je povećanim brojem T reg limfocita na periferiji i na majčinsko-fetalnoj površini (19). Smatra se da djelići TB koji dospiju u majčinu cirkulaciju rezultiraju sistemskim odgovorom na očeve antigene izazivajući proliferaciju T reg limfocita (20).

Prema današnjim spoznajama PE je bolest koja se razvija u dva stadija: 1) rani, tzv. posteljični stadij poremećene invazije TB-a; 2) kasni, tzv. sistemski stadij koji je karakteriziran sistemskim upalnim odgovorom, uključujući leukocite i endotel (17,21). Iako je patofiziologija nastanka PE nepoznata, jasno je da je prisutnost posteljice osnova za nastanak bolesti, a rođenjem djeteta i posteljice simptomi nestaju unutar 48-72 sata te je završetak trudnoće i dalje jedini uspješan način liječenja PE (22).

Preeklampsija još uvijek predstavlja značajan problem porodništva i neonatologije. Jednom dijagnosticirana predstavlja čimbenik rizika ponovnog pojavljivanja u svakoj slijedećoj trudnoći, zato je svako istraživanje koje bi rasvjetlilo mehanizme njenog nastanka od iznimne važnosti.

1.3 T REGULACIJSKI LIMFOCITI I PRIRODNOUBOJIČKE STANICE

1.3.1 T regulacijski limfociti u normalnoj trudnoći i preeklampsiji

Trudnoća je stanje organizma koje zahtjeva modulaciju imunološkog odgovora majke da ne dođe do odbacivanja ploda budući je ljudski fetus polualograft jer je pola genetskog materijala očevog porijekla. Neka istraživanja su pokazala da očuvanje trudnoće nije posljedica nereagiranja imunološkog sustava majke na plod, već pokretanje niza složenih imunoloških reakcija (23,24). Greška u majčinoj toleranciji može voditi različitim patološkim stanjima kao što su spontani pobačaji, VUE i PE. Posteljica je jedinstveni organ putem kojeg se ostvaruje komunikacija majke i djeteta. Mjesto interakcije u posteljici predstavljaju posteljične resice na čijoj su površini specijalizirane epitelne stanice tj. TB te intervilozni prostor u kojem je majčina krv. Trofoblast utječe na diferencijaciju majčinih CD4+ pomagačkih limfocita na Th1, Th2, T reg i Th17 limfocite. Razvoj Th1 i Th2 odgovora ovisi o citokinima koji se proizvode u mikrookolišu za vrijeme prezentacije antigena. Dinamika izlučivanja citokina, koji su mali topivi proteini regulirani putem imunološkog sistema, mijenja se tijekom trudnoće što upućuje na njihovu specifičnu ulogu u različitim fazama trudnoće (25,26). Stanice TB-a proizvode najviše citokina, iako ih stvaraju i stanice decidue, stanice posteljičnih ovoja te leukociti koji se ondje nalaze. Oni se prema učinku dijele na proupalne i protuupalne. Mišljenje je da je balans u lokalnoj proizvodnji proupalnih i protuupalnih citokina kritičan za uspješnu trudnoću (27,28). Th1 stanice utječu na citotoksičnost i inhibirane su u normalnoj trudnoći. Izlučuju interferon-gama (IFN-γ), interleukin 2 (IL2) i tumor nekrotizirajući čimbenik-beta (TNF-β), a glavna im je zadaća razvoj stanične imunosti i pomoć u diferencijaciji citotoksičnih limfocita. Th2 stanice preveniraju odbacivanje fetusa putem inhibicije aktivacije Th1 stanica. One izlučuju IL4, IL5, IL6, IL10 koji potpomažu razvoj protutijela (30). Novija istraživanja ukazuju na važnost T reg limfocita u imunoregulaciji i aktiviranju periferne tolerancije (18). Normalna ljudska trudnoća karakterizirana je povećanim brojem T reg limfocita na periferiji i na maternalno fetalnoj površini. Budući da igraju značajnu ulogu u održavanju tolerancije i kontrole patološkog imunog odgovora, moguće je da je poremećaj te kontrole čimbenik u razvoju PE (19). T regulacijski limfociti izražavaju markere CD4, CD25 i FOXP3. S obzirom da oni mogu biti i CD25 negativni, FOXP3 marker je mnogo pouzdaniji u njihovoj identifikaciji (28). Uloga T reg limfocita u etiopatogenezi PE i mogućoj ulozi u nastanku VUE za sada nije poznata (18). Th 17

limfociti su najnovije identificirana subpopulacija CD4+ limfocita. Izlučuju IL 17 koji uzrokuje upalnu i tkivnu destrukciju. Kombinacija citokina koji stimuliraju diferencijaciju humanih Th17 stanica predmet je rasprava (31,32).

1.3.2 Prirodnoubojičke stanice u normalnoj trudnoći i preeklampsiji

Prirodnoubojičke NK stanice imaju svojstvo citotoksičnosti tj. sposobnost razaranja drugih stanica. Međutim na stanice TB ne djeluju citotoksično već izlučuju citokine koji imaju važnu ulogu u proliferaciji i diferencijaciji TB i s njima sudjeluju u pravilnom remodeliranju spiralnih arterija (27). Prirodnoubojička stanična citotoksična aktivnost regulirana je putem aktivacijskih i inhibicijskih signala pa je prema tome balans između dotičnih signala važan za održavanje uspješne trudnoće. Njihova populacija razlikuje se bitno između periferne krvi i decidue tj. ležišta posteljice. Decidualne NK stanice luče citokine koji se dramatično mijenjaju tijekom trudnoće (27). One su također važan izvor angiogenih faktora u posteljičnom ležištu što utječe na vaskularnu stabilizaciju i funkciju(29). Čini se da neusklađena ravnoteža između citokina i angiogenih faktora može putem NK stanica inducirati preeklampsiju (27). Mnoga pitanja u vezi NK stanica ostaju neodgovorena te su potrebna dodatna istraživanja da bi se u potpunosti razumjela njihova uloga u trudnoći i PE.

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

1. Glavni cilj istraživanja je odrediti vrstu i broj T limfocitnog infiltrata, među ostalim i broj T reg limfocita u žarištima VUE posteljica trudnoća kompliciranih PE te ih usporediti s vrstom i brojem u posteljicama s VUE bez PE. U svrhu provođenja cilja imunohistokemijski se istražuje u žarištima VUE vrsta i broj upalnih stanica i to: CD4+, CD25+, FOXP3+, CD8+, CD3+, CD45LCA limfociti i CD68+ makrofazi.

Očekuje se da je vrsta i broj upalnog T limfocitnog infiltrata različita u ispitivanim skupinama, a broj T reg limfocita manji u žarištima VUE posteljica trudnoća kompliciranih PE u odnosu na posteljice s VUE bez PE.

2. Cilj istraživanja je odrediti broj i vrstu T limfocitnog infiltrata i NK stanica u decidui bazalis iz trudnoća kompliciranih PE s VUE te ih usporediti s vrstom i brojem u decidui bazalis posteljica s VUE bez PE i decidui bazalis posteljica iz urednih trudnoća. U tom smislu imunohistokemijski se istražuju: CD4+, CD25+, FOXP3+, CD56+ limfociti.

Očekuje se da je broj T reg limfocita i NK stanica smanjen u decidui bazalis posteljica iz trudnoća kompliciranih PE s VUE u odnosu na one bez PE samo s VUE i one iz urednih trudnoća.

3. Istražiti stupanj (niski i visoki) i žarišta (žarišni, više žarišni i difuzni) VUE u posteljicama obaju ispitivanih skupina.

U posteljicama iz trudnoća kompliciranih PE s VUE očekuje se veći stupanj i više žarišta.

3 MATERIJALI I METODE ISTAŽIVANJA

3.1 MATERIJAL

Materijal predstavljaju posteljice trudnoća koje su odabrane na temelju sljedećih kriterija:

A) Kriteriji uključenja u studiju:

-jednoplodna trudnoća trećeg tromjesečja s kliničkom dijagnozom PE prema kriterijima međunarodnih udruženja uz prisutstvo VUE.

-jednoplodna trudnoća trećeg tromjesečja samo s VUE

-iako treće tromjesečje označava razdoblje trudnoće od 28.tjedna u studiju su uključene posteljice od 33. do navršenog 42. tjedna kako odstupanja u gestacijskim tjednima ne bi bila prevelika.

B) Kriteriji isključenja iz studije:

-klinički znaci upale i / ili patohistološki nalaz vilitisa upalne etiologije, chorioamnionitisa

-jednoplodna trudnoća trećeg tromjesečja bez kliničke dijagnoze PE i bez VUE

3.2 METODE ISTRAŽIVANJA

3.2.1 Patohistološki pregled posteljice

Posteljice su skupljane odmah po porodu, fiksirane u 10% puferiranom formalinu i proslijeđene na patohistološku analizu. Uzorci tkiva posteljice uzimani su prema standardnom protokolu: jedan uzorak uz rub posteljice i dva uzorka iz centralnog dijela makroskopski urednog tkiva. Svi uzorci posteljice pregledani su od strane dva patologa specijalizirana za ginekološku patologiju u cilju objektivnosti rezultata. Tkivo je nakon obrade uklopljeno u parafin, rezano rotacijskim mikroskopom na 4 µm i bojano hemalaun-eozin metodom (HE). Za mikroskopsku analizu preparata koristio se mikroskop marke Olympus BX41 i Cell D1 Image softver (Olympus). Mikroskopskim pregledom posteljice određeni su: žarišta vilitisa (žarišni, više žarišni, difuzni) i stupanj vilitisa (niski, visoki).

3.2.2 Imunohistokemijska metoda

Imunohistokemijskom metodom utvrđen je imunofenotip upalnih stanica u žarištima VUE i decidui bazalis korištenjem slijedećih markera: CD3, CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD45LCA, CD68 i CD56. Parafinski rezovi posteljice debljine 4 µm postavljeni su na „superfrost plus“ (Thermoscientific, Braunschweig, Germany) predmetna stakla.

Imunohistokemijsko bojanje napravljeno je u automatskom bojaču (Ventana Bench Mark Ultra autostainer, Ventana Roche, Tuscon, AZ) uz primjenu slijedećih protutijela:

a) primarno mišje monoklonalno CD4 „ready to use“ (tvornički određena koncentracija) protutijelo u inkubaciji 32 minute, kuhanje u CC1 ph=8 puferu 64 minuta.
b) primarno mišje monoklonalno CD8 „ready to use“ protutijelo u inkubaciji 32 minute, kuhanje u CC1 ph=8 puferu 52 minute.
c) primarno zečje monoklonalno CD3 „ready to use“ protutijelo u inkubaciji 32 minuta, kuhanje u CC1 ph=8 puferu 54 minute.
d) primarno mišje monoklonalno CD25 „ready to use“ protutijelo u inkubaciji 16 minuta, kuhanje u CC1 ph=8 puferu 36 minuta.
e) primarno mišje monoklonalno CD 45 LCA „ready to use“ protutijelo u inkubaciji 24 minute, kuhanje u CC1 ph=8 puferu 20 minuta.

f) primarno mišje monoklonalno CD68 „ready to use“ protutijelo u inkubaciji 20 minuta, kuhanje u CC1 ph=8 puferu 36 minuta.

UltraView Universal DAB Detection Kit (Ventana, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) je korišten kao sekundarno antitijelo. Pozitivnim obojenjem za gore navedena antitijela smatrala se smeđa obojenost membrane i/ili citoplazme.

Za primarno mišje monoklonalno FOXP3 protutijelo (Abcam, Cambridge, UK) rezovi posteljice postavljeni su na „superfrost plus“ (Thermoscientific, Braunschweig, Germany) predmetna stakla. Nakon deparafinizacije u ksilolu slijedila je rehidracija kroz alkohole sve niže koncentracije te kuhanje u puferu (pH=9) kroz 20 minuta u mikrovalnoj peći snage 700W. Nakon hlađenja preparata slijedilo je ispiranje u destiliranoj vodi (2x) i otopini fosfatnog pufera (3x). Daljnja obrada vršila se u automatskom bojaču (DAKO, Danska), a sastojala se od tretiranja preparata 3% otopinom vodikova peroksida kroz 10 minuta, ispiranja u dvostruko destiliranoj vodi uz primjenu primarnih protutijela.

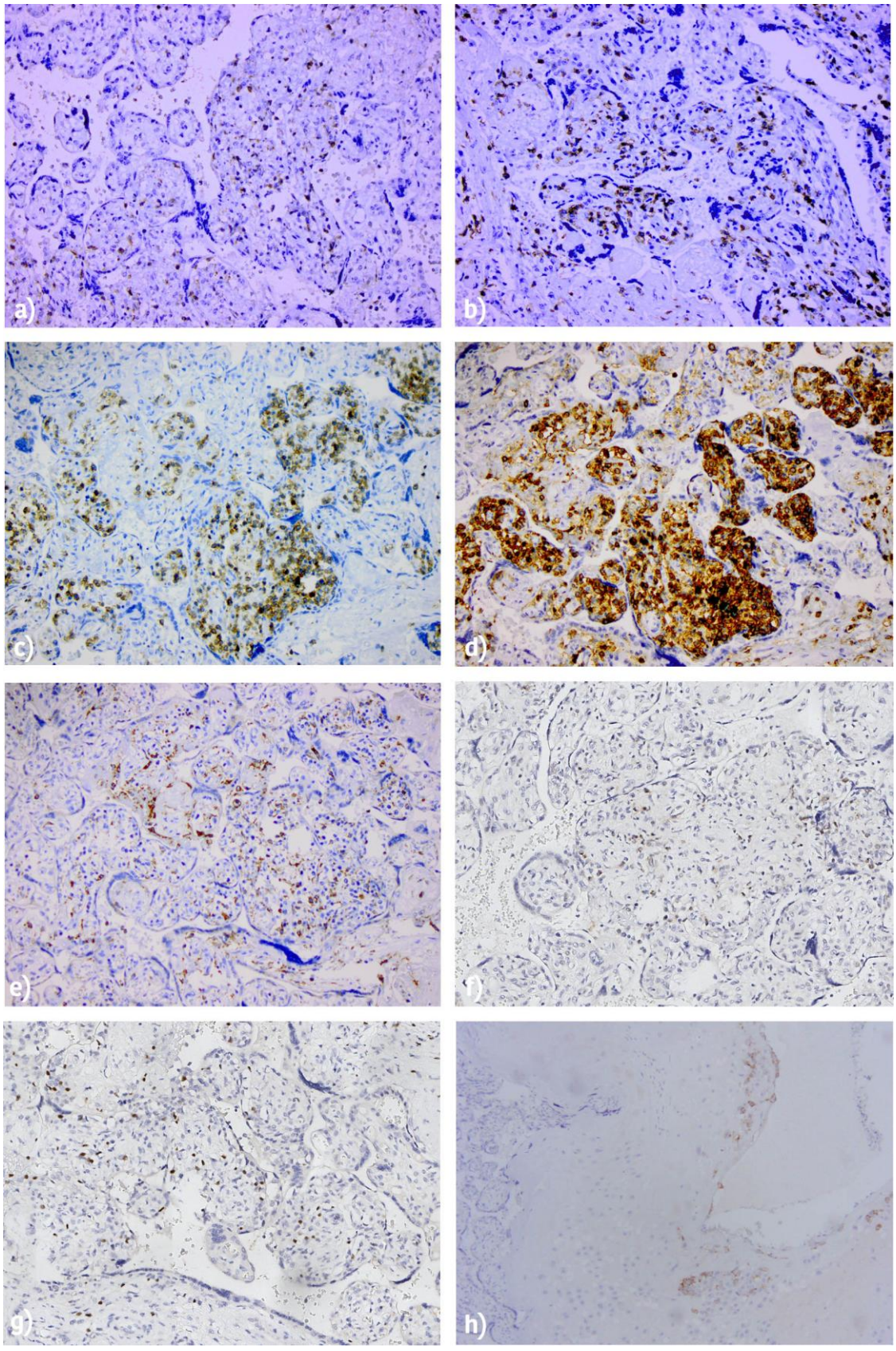
Inkubacija je bila u koncentraciji 1:50 s tvorničkim razrijeđenjem kroz jedan sat na temperaturi 21^{o} C. Slijedilo je ispiranje PBS-om i primjena sekundarnog protutijela (LSAB metoda, DAKO, Danska) kroz 30 minuta te ponovno ispiranje PBS-om. Vizualizacija je sprovedena primjenom kromogena diaminobenzidina (DAB, DAKO, Glostrup, Danska) i supstrata (1 kap kromogena / 1 ml supstrata) koji su inkubirani tijekom 10 minuta, isprani u tekućoj vodi tri puta i kontrastno obojeni hematoksilinom. Nakon dehidracije u alkoholima sve većih koncentracija i ispiranja ksilolom slijedilo je pokrivanje u automatskom poklapaču (DAKO, Glostrup, Danska). Pozitivnim obojenjem smatrala se smeđa obojenost jezgre. Pozitivna kontrola su bili preparati tonzile.

Za imunohistokemijski prikaz NK stanica korišten je slijedeći protokol. Parafinski rezovi posteljice debljine 0,4 µm postavljeni su na „superfrost plus“ (Thermo Scientific, Gerhard Menzel, Njemačka) predmetna stakla, nakon čega je slijedila daljnja obrada i bojanje u automatskom bojaču Ultra Ventana BenchMark Stainig Module (Ventana, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), a sastojala se od kuhanja u puferu CC1, ph 8,2 (HIER) (Ventana, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 36 minuta i inkubacije primarnog monoklonalno mišjeg „ready to use“ (tvornički određena koncentracija) protutijela CD56 tijekom 36 minuta. Kao sekundarno protutijelo koristio se UltraView Universal DAB

Detection Kit (Ventana, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka). Pozitivnim obojenjem smatrala se smeđa obojenost membrane.

Za imunohistokemijsku procjenu FOXP3 i ostalih stanica upalnog infiltrata korišten je isječak iz posteljice u kojemu je histološki dijagnosticiran VUE, a analizirana su sva žarišta vilitisa. Izbrojeni su FOXP3 pozitivni limfociti unutar svih žarišta VUE-a i na 5 vidnih polja velikog povećanja decidue bazalis (1 mm^2). Od ostalih stanica upalnog infiltrata izbrojene su CD4, CD25, CD8, CD3, CD45 LCA i CD68 pozitivne stanice u svim žarištima VUE istog isječka, CD4, CD25, FOXP3, te CD56 pozitivne stanice na 5 vidnih polja velikog povećanja decidue bazalis istih posteljica. U skupini kontrolnih posteljica iz urednih trudnoća bez prisutnog histološkog nalaza vilitisa bile su izbrojene CD4, CD25, FOXP3 i CD56 pozitivne stanice u decidui bazalis na 5 vidnih polja velikog povećanja (Slika 8.).

Brojanje pojedinih tipova upalnih stanica obavljeno je na vidnom polju velikog povećanja (objektiv X40) uz pomoć programa Cell D1 Image analysis (Olympus).



Slika 8. Imunohistokemijski prikaz stanica u posteljici: a) CD3+ stanice; b) CD4+ stanice; c) CD8+ stanice; d) CD45LCA stanice; e) CD68+ stanice; f) CD25+ stanice; g) FOXP3 stanice; h) CD56+ stanice (IHKx200)

3.2.3 Statističke metode

Veličina uzorka u svakoj skupini od n=25 bila je potrebna da bi se ostvarila statistička snaga od 80% u odbacivanju nulte hipoteze o jednakim aritimetičkim sredinama između VUE s i bez PE, ako je populacijska prosječna razlika u CD4 AS=160 sa standardnom devijacijom SD=200 u obje skupine, uz razinu statističke značajnosti određenoj na $p<0.05$ te uz upotrebu dvosmjernog t-testa za neovisne uzorke i bez zadovoljene pretpostavke homogenosti varijance. Podaci potrebni za izračun uzeti su iz pilot istraživanja napravljenog na n=6 posteljica s PE i n=4 bez PE. Istraživanje je provedeno na Klinici za ginekologiju i opstetriciju i Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Kliničkog bolničkog centra Split. Studija je dizajnirana kao retrospektivna, dvostruko slijepa, a odobrilo ju je Etičko povjerenstvo KBC Split. Ukupno su prikupljene 54 posteljice u kojima je histološki dokazan vilitis nepoznate etiologije, od toga n=27 s i n=27 bez PE. Za kontrolnu skupinu koja nam je služila za izradu drugog cilja ovog rada korištene su posteljice urednih trudnoća i to njih n=20.

Razina statističke značajnosti je određena na $p<0,05$ i svi su intervali pouzdanosti dani na 95%-tnoj razini. S obzirom na to da su raspodjele svih numeričkih varijabli statistički značajno odstupale od teorijski očekivane normalne raspodjele, kao mjere središnje tendencije i raspršenja dani su medijani i interkvartilni rasponi. Normalnost raspodjela provjeravana je Shapiro-Wilk testom. Analiza statističke značajnosti razlika između tri promatrane skupine napravljena je χ^2 testom, a između VUE s i bez PE napravljena je Fisherovim egzaktnim testom za kvalitativne varijable. Univarijatna analiza statističke značajnosti razlike u broju T limfocita između posteljica s VUE i PE, VUE bez PE i kontrolne skupine napravljena je Kruskal Wallisovim testom, a između posteljica s VUE s i bez PE napravljena je Mann-Whitney U testom s dvosmjernim Monte Carlo izračunom statističke značajnosti na temelju uzorka od 10000 tablica. Prikazana je razlika između dva medijana. Intervali pouzdanosti razlike između dva medijana izračunati su metodom koju su predložili Bonett i Price (33). Kontrola mogućeg moderatorskog utjecaja žarišta i stupnja VUE, broja prethodnih poroda, majčine dobi, porođajne težine, trajanja poroda i gestacijske dobi napravljena je hijerarhijskom, multivarijatnom, binarnom logističkom regresijskom analizom. Kao standardizirane mjere veličine učinaka dani su omjeri izgleda i 95%-tni intervali pouzdanosti. Multivarijatna analiza napravljena je na standardiziranim vrijednostima T limfocita. Standardizacija je napravljena

tako da je od svakog podatka oduzeta aritmetička sredina svih podataka, a zatim je ta razlika podijeljena standardnom devijacijom. U multivarijatnoj logističkoj analizi za CD4 + limfocite u decidui između skupina VUE s PE i kontrole bilo je potrebno kategorizirati porođajnu masu, gestacijsku dob i standardiziranu vrijednost CD4+. Porođajna masa podijeljena je u 5 skupina (≤2 kg; 2,1-2,5 kg; 2,51-3,0 kg; 3,1-3,5 kg; >3,5 kg). Gestacijska dob podijeljena je u 4 kategorije (≤36; 37; 38; >38). Standardne vrijednosti CD4+ limfocita podijeljene su u 6 kategorija (-1SDdo-0,5SD; -0,51SDdo0; 0-0,5SD; 0,51SD-1SD; 1,1SDdo2SD; >2SD). Broj poroda, majčina dob, porođajna dužina su korišteni u ovoj regresiji u izvornom obliku. Sve obrade podataka napravljene su u programu R, Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL. Analiza statističke snage istraživanja i potrebne veličine uzorka napravljena je u programu Hintze J. (2014). PASS 13. NCSS,LLC. Kaysville, Utah, USA.

4 REZULTATI

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

4.1 Demografska obilježja ispitivanih skupina

Kliničke karakteristike skupina s VUE s i bez PE za ostvarivanje prvog cilja prikazane su Tablici 2. Nije pronađena statistički značajna razlika između skupina prema životnoj dobi rodilja (p>0,999), paritetu (p>0,999), gestacijskoj dobi (p>0,999), masi djeteta (P>0,999) u ispitivanim skupinama.

Tablica 2. Demografska obilježja ispitivanih skupina: VUE s i bez PE

	VUE s PE		VUE bez PE		p
n (%)	(n=27)		(n=27)		
Dob rodilje*	32	(25-38)	32	(26-34)	0.305†
Paritet					
prvi	20	(74.1)	18	(66.7)	0.872**
drugi ili više	7	(25.9)	9	(33.3)	
Porođajna masa (kg)*	2.7	(2.3-3.6)	2.9	(2.6-3.4)	0.494†
Porođajna dužina (cm)*	48	(45-50)	49	(48-50)	0.278†
Gestacijska dob (tjedni)*	38	(37-40)	39	(38-40)	0.233†

VUE, vilitis nepoznate etiologije; PE, preeklampsija

*medijan (interkvartilni raspon); ** Fisher exact 2-sided test za kategorijske varijable;

†Mann-Whitney U test za brojčane varijable

4.2 Demografska obilježja ispitivanih skupina i kontrolne skupine

Kliničke karakteristike ispitivanih skupinas VUE s i bez PE u odnosu na kontrolnu skupinu za ostvarivanje drugog cilja ovog rada prikazane su u Tablici 3. Nije pronađena statistički značajna razlika između rodilja prema životnoj dobi (p=0,487), paritetu (p=0,762), porođajnoj dužini (p=0,228) između ispitivanih skupina. Postoji statistički značajna razlika u porođajnoj masi djeteta (p=0,002), te gestacijskoj dobi (p=0,010) u ispitivanim skupinama.

Između skupine VUE s PE i kontrolne skupine nismo dokazali statistički značajnu razliku u godinama života (p=0,635), porođajnoj dužini (p=0,097) i gestaciji (p=0,279), a medijan porođajne mase djece iz kontrolne skupine za 0,8 kg je veći nego u skupini VUE s PE (p<0,001).

Između skupine VUE bez PE i kontrolne skupine nismo pronašli statistički značajnu razliku u godinama života (p=0,364) i porođajnoj dužini (p=0,097). Porođajna masa je za 0,6 kg veća u kontrolnoj skupini nego u skupini VUE bez PE (p=0,002). Medijan gestacijske dobi u skupini VUE bez PE za 1 tjedan je duži nego u kontrolnoj skupini (p<0,01).

Tablica 3. Demografska obilježja ispitivanih skupina: VUE s i bez PE, kontrolna skupina

	VUE s PE		VUE bez PE		Kontrola		
n(%)	(n=27)		(n=27)		(n=20)		P
Dob rodilje*	32	(25-38)	32	(26-34)	30,5	(28-37)	0,487†
Paritet							
prvi	20	(74.1)	18	(66.7)	13	(65)	0,762**
drugi ili više	7	(25.9)	9	(33.3)	7	(35)	
Porođajna masa (kg)*	2.7	(2.3-3.6)	2.9	(2.6-3.4)	3.5	(2,5-3,3)	0.002†
Porođajna dužina (cm)*	48	(45-50)	49	(48-50)	49,5	(48-50)	0.228†
Gestacijska dob (tjedni)*	38	(37-40)	39	(38-40)	38	(37-38)	0,010†

VUE, vilitis nepoznate etiologije; PE, preeklampsija

*medijan (interkvartilni raspon); ** χ^2 test za kategorijske varijable; † Kruskal Wallis test za brojčane varijable

4.3 Obilježja VUE ispitivanih posteljica

Patohistološka obilježja posteljica s VUE s i bez PE u smislu broja žarišta i stupnja vilitisa prikazana su u Tablici 4. Nije pronađena statistički značajna razlika između broja žarišta (p>0,999) i stupnja (p>0,999) VUE između ispitivanih skupina.

Tablica 4**.** Broj žarišta i stupanj VUE u ispitivanim posteljicama

	VUE s PE		VUE bez PE		P*
n (%)	(n=27)		(n=27)		
Posteljice					
Žarišta					
fokalni	19	(70.4)	19	(70.4)	>0.999
multifokalni ili difuzni	8	(29.6)	8	(29.6)	
Stupanj					
niski	14	(51.9)	15	(55.6)	>0.999
visoki	13	(48.1)	12	(44.4.)	

VUE, vilitis nepoznate etiologije; PE, preeklampsija

* Fisher exact 2-sided test za kategorijske varijable

4.4 Vrsta i broj staničnog upalnog infiltrata i T regulacijskih limfocita u žarištima VUE i njihova usporedba između ispitivanih skupina

Univarijatna analiza ukazala je na statistički značajne razlike u ukupnom broju CD4+ limfocita ($p=0,01$), broju resica infiltriranih sa CD4+ limfocitima ($p<0,001$) između ispitivanih skupina. Nije uočena statistički značajna razlika vrste i ukupnog broja upalnih stanica, niti broja zahvaćenih resica ispitivanih posteljica infiltriranih s CD3, CD8, CD45 limfocitima i CD68 makrofazima što je prikazano u Tablici 5. Broj T reg limfocita koji su CD4+CD25+FOXP3+ u žarištima vilitisa nije se statistički značajno razlikovao u ispitivanim skupinama, štoviše u obje skupine bili su prisutni u malom broju.

Tablica 5. Broj CD3, CD4, CD8, CD25 i FOXP3, CD45LCA, CD68 pozitivnih stanica u žarištu VUE ispitivanih posteljica nakon trudnoća s i bez PE

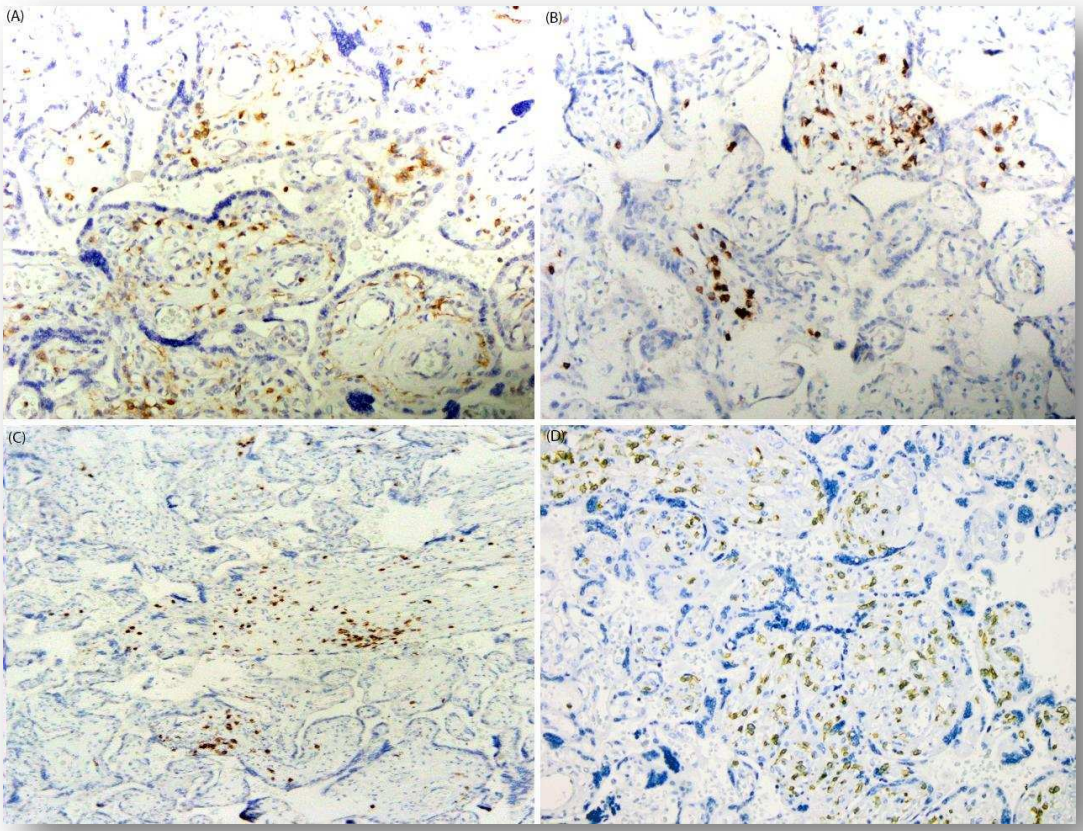
n	VUE s PE (n=27)		VUE bez PE (n=27)		d	95% CI	P*
CD3 ukupan broj	600	(200-1255)	500	(40-900)	100	(3-210)	0,132
Broj resica s CD3	120	(10-460)	40(0-	1060)	80	(30-200)	0,110
CD4 ukupan broj	309	(131-740)	55	(0-440)	254	(-35-543)	0,01
Broj resica s CD4	50	(10-120)	10	(0-50)	40	(-6-85)	<0,001
CD25 ukupan broj	0	(0-6)	0	(0-21)	0	(-7-7)	0,198
Broj resica s CD25	0	(0-5)	0	(0-10)	0	(-4-4)	0,245
FOXP3 ukupan broj	0	(0-18)	0	(0-17)	0	(-2-2)	0,570
Broj resica s FOXP3	0	(0-8)	0	(0-2)	0	(-1-1)	0,478
CD8 ukupan broj	170	(79-500)	200	(0-564)	-30	(-264-205)	0,843
Broj resica s CD8	10	(10-70)	27	(0-91)	-17	(-48-14)	0,773
CD45LA ukupan broj	100	(90-170)	150	(50-337)	-50	(-169-69	0,755
Broj resica s CD45LA	20	(10-50)	10	(10-50)	10	(-11-31)	0,329
CD68 ukupan broj	118	(10-480)	100	(20-260)	18	(-173-209)	0,347
Broj resica s CD68	10	(1-60)	10	(0-34)	0	(-20-20)	0,184

Rezultati su predstavljeni kao medijani (interkvartilni rasponi)

VUE, vilitis nepoznate etiologije; PE, preeklampsija; d, razlika između dva medijana; 95% CI, 95%-tni interval pouzdnosti razlike između medijana; * Mann Whitney U test, dvosmjerni Monte Carlo test statističke značajnosti

4.5 Odnos CD4+ i CD8+ staničnog upalnog infiltrata u žarištima VUE između ispitivanih skupina

Kontrola mogućeg moderatorskog utjecaja žarišta i stupnja VUE, broja prethodnih poroda, majčine dobi, porođajne težine i gestacijske dobi napravljena je hijerarhijskom, multivarijatnom, binarnom logističkom regresijskom analizom između dvije proučavane skupine s obzirom na ukupni broj te omjer CD4+ i CD8+ limfocita (Slika 9.). Nakon prilagodbe za navedene kategorije, hijerarhijskom multivarijatnom binarnom logističkom regresijom, razlika između dvije navedene skupine u standardiziranim vrijednostima ukupnog broja CD4+ limfocita (p=0,009), broja resica saturiranih CD4+ limfocitima u žarištu VUE (p=0,005) i omjer CD4+/CD8+ limfocita u posteljicama s VUE s i bez PE (p=0,03) bila je statistički značajna, što je prikazano u Tablici 6.



Slika 9. A-CD4+ limfociti u posteljici s VUE bez PE; B-CD8+ limfociti u posteljici s VUE bez PE; C-CD4+ limfociti u posteljici iz trudnoća s VUE kompliciranih PE; D-CD8+ limfociti u posteljici iz trudnoća s VUE kompliciranih PE (IHKx200)

Tablica 6. Odnos broja CD4+ i CD8+ limfocita, broja resica zahvaćenih CD4+ i CD8+ limfocitima te njihovog omjera u žarištima VUE između ispitivanih skupina, razlika između dva medijana i odds ratio standardiziranih vrijednosti prilagođenih karakteristikama posteljice

	VUE s preeklampsijom (n=27)		VUE bez preeklampsije (n=27)		d	95% CI	P	OR	95% (CI)	p_{adj}
CD4 ukupan broj	309	(131-740)	55	(0-440)	254	(-35-543)	0.01	3.97	(1.40-11.24)	0.009
Broj resica infiltriranih CD4	50	(10-120)	10	(0-50)	40	(-6-85)	<0.001	15.69	(2.34-105.46)	0.005
CD8 ukupan broj	170	(79-500)	200	(0-564)	-30	(-264-205)	0.843	0.81	(0.38-1.71)	0.809
Broj resica infiltriranih CD8	10	(10-70)	27	(0-91)	-17	(-48-14)	0.773	0.74	(0.35-1.59)	0.446
CD4/CD8 omjer	0.88	(0.56-5.68)	0.32	(0.0-1.76)	0.57	(-0.42-1.55)	0.036	7.91	(1.22-51.18)	0.03

Rezultati su predstavljeni kao medijani (interkvartilni rasponi); VUE, vilitis nepoznate etiologije; d, razlika između dva medijana; 95% CI, 95%-tni interval pouzdanosti razlike između medijana; p, Mann Whitney U test, dvosmjerna Monte Carlo statistička značajnost bazirana na 10000 uzorkovanoj tablici; OR, omjer za VUE s preeklampsijom prilagođeno stupnju i gradusu VUE, paritetu, godinama majke, porođajnoj masi, porođajnoj dužini i gestacijskoj dobi putem hijerarhijske multivarijatne binarne logičke regresije; 95% CI , 95%-tni interval pouzdanosti za omjer; p_{adj}, rezultat logičke regresije

4.6 Odnos T regulacijskih limfocita i prirodnoubojičkih stanica u decidui ispitivanih skupina i kontrolne skupine

Univarijatna analiza ukazala je na statistički značajne razlike u broju CD4+ limfocita u decidui između istraživanih skupina (p=0,003). Medijan CD4+ limfocita u skupini VUE s PE za 170 je veći nego u skupini VUE bez PE (p=0,007). Medijan CD4+ limfocita u skupini VUE s PE je za 125 veći nego u kontrolnoj skupini (p=0,002). Statistički značajne razlike nije bilo između VUE bez PE i kontrolne skupine.

CD25+ i FOXP3+ bili su negativni.

Nismo dokazali statistički značajnu razliku u vrijednostima NK stanica između ispitivanih skupina (p=0,638) što se vidi iz Tablice 7.

Tablica 7. Broj CD4+ limfocita i NK stanica u decidui ispitivanih posteljica i kontroli

	VUE s PE (n=27)		VUE bez PE (n=27)		kontrola		P*
CD4	190	(100-268)	20	(0-160)	60	(40-115)	0,003
CD56	0	(10-120)	0	(5-145)	0	(0-0)	0,638

Rezultati su predstavljeni kao medijani (interkvartilni raspon)

VUE, vilitis nepoznate etiologije; PE, preeklampsija;

* Kruskal Wallisov test za brojčane varijable

Kontrola mogućeg moderatorskog utjecaja broja prethodnih poroda, majčine dobi, porođajne težine, porođajne dužine i gestacijske dobi na dobivene rezultate u svezi ukupnog broja CD4+ limfocita u decidui napravljena je hijerarhijskom, multivarijatnom, binarnom logističkom regresijskom analizom između skupina VUE s i bez PE kao i između skupina VUE s PE i kontrolne skupine. Nakon prilagodbe za navedene varijable izgled za VUE s PE u odnosu na VUE bez PE raste s porastom CD4+ za 1,83 puta na razini značajnosti 94% što se vidi iz Tablice 8., a izgled za VUE s PE u odnosu na kotrolnu skupinu raste s porastom CD4+ za 5,9 puta što se vidi iz Tablice 9.

Tablica 8. Broj CD4+ limfocita u decidui posteljica s VUE s PE i VUE bez PE; uz razliku između dva medijana; odds ratio standardiziranih vrijednosti prilagođenih demografskim obilježjima

	VUE s PE (n=27)		VUE bez PE (n=27)		D	95% CI	P*	OR	95% (CI)	p_{adj}
CD4 ukupan broj	190	(100-268)	20	(0-160)	170	77,2-262,8	0.007	1,83	(0,98-3,3)	0.059

Rezultati su predstavljeni kao medijani (interkvartilni rasponi); VUE, vilitis nepoznate etiologije; d, razlika između dva medijana; 95% CI, 95%-tni interval pouzdanosti razlike između medijana; * Mann Whitney U test, dvosmjerna Monte Carlo statistička značajnost bazirana na 10000 uzorkovanoj tablici; OR, omjer za VUE s preeklampsijom prilagođeno, porođajnoj masi i gestacijskoj dobi putem hijerarhijske multivarijatne binarne logičke regresije; 95% CI, 95% -tni interval pouzdanosti za omjer; p_{adj}, rezultat logičke regresije.

Tablica 9. Broj CD4+ limfocita u decidui posteljica s VUE s PE i kontrolne skupine uzrazliku između dva medijana i odds ratio standardiziranih vrijednosti prilagođenih demografskim obilježjima

	VUE s PE (n=27)		Kontrola (n=20)		D	95% CI	P*	OR	95% (CI)	p_{adj}
CD4 ukupan broj	190	(100-268)	65	(40-115)	125	53,3-196,7	0.002	5,9	(1.4-24,4)	0.017

Rezultati su predstavljeni kao medijani (interkvartilni rasponi); VUE, vilitis nepoznate etiologije; d, razlika između dva medijana; 95% CI, 95%-tni interval pouzdanosti razlike između medijana; * Mann Whitney U test, dvosmjerna Monte Carlo statistička značajnost bazirana na 10000 uzorkovanoj tablici; OR, omjer za VUE s preeklampsijom prilagođeno porođajnoj masi i gestacijskoj dobi putem hijerarhijske multivarijatne binarne logičke regresije; 95% CI, 95%-tni interval pouzdanosti za omjer; p_{adj}, rezultat logičke regresije.

5 RASPRAVA

PE je multisistemska bolest trudnoće koja je unatoč brojnim istraživanjima i danas nejasne etiologije, a čini vodeći uzrok perinatalnog i maternalnog morbiditeta i mortaliteta. Novija istraživanja usmjerena su na posteljicu kao uzroku njenog nastanka (22). Posljednjih godina istraživanja upućuju na generaliziranu upalnu reakciju kao moguće objašnjenje kliničkih simptoma ove bolesti (34).

VUE je zagonetna i razarajuća upalna lezija posteljice karakterizirana infiltracijom predominantno majčinih upalnih stanica u posteljičnim resicama. Ova infiltracija usporediva je s transplantacijom imunokompetentnih alogenih imunocita u fetalne organe; to bi potencijalno ustanovilo situaciju analognu reakciji presatka protiv primaoca (GVHD) od strane majčinih stanica (presadak) u fetalnom (primalac) tkivu (35).

Ovo istraživanje koje je načinjeno na većem broju uzoraka u odnosu na dosadašnja istraživanja, potvrdilo je da se upalni infiltrat u VUE sastoji od T limfocita i to predominantno CD4+, CD8+, kao i CD68+ makrofaga. Pokazalo je da žarišta vilitisa posteljica s VUE iz trudnoća kompliciranih PE imaju veći broj CD4 T pozitivnih limfocita, kao i CD4+/CD8+ omjer nego posteljice s VUE bez PE. Broj CD4+ limfocita u decidui također je statistički značajno veći u posteljicama s VUE i PE nego u posteljicama s VUE, a bez PE i kontrolnoj skupini urednih trudnoća. Dosadašnje studije koje su analizirale odnos CD4+ i CD8+ limfocita u žarištima VUE pokazale su različite rezultate. Starija istraživanja pokazuju pojačanu ekspresiju CD4+, dok novija pokazuju pojačanu ekspresiju CD8+ limfocita (36-38). Različiti rezultati mogu među ostalim biti objašnjeni osjetljivošću pojedinih antitijela, veličinom uzorka, nesigurnim kriterijima uključenja i isključenja za proučavanu skupinu ili uključenjem različitih entiteta u istu skupinu. Glavna prednost ovog istraživanja u usporedbi s drugima je u usklađenosti skupine VUE s PE i VUE bez PE, kako u pogledu žarišta upale tako i stupnja VUE. Posebno bitnim smatram da nije bilo razlike u medijanu trajanja trudnoće i porođajnoj masi jer su dosadašnja istraživanja uključivala i nedonošene trudnoće što s obzirom na kompleksnost etiopatogeneze prijevremenog porođaja značajno ograničava tumačenje dobivenih rezultata. I među podacima o paritetu i duljini novorođenčeta nije bilo statistički značajne razlike između skupina. Jedan od nedostataka ovog istraživanja je korištenje imunohistokemije kao semikvantitativne metode procjene koja je podložna subjektivnosti istraživača. Druga značajna primjedba je nemogućnost donošenja zaključaka o uzročnom

odnosu između VUE i PE jer se radi o presječnom istraživanju. Studija koja ima ukupno najveći broj ispitanica s VUE uključuje trudnice s IUZR, PE, IUZR i PPROM, međutim u svakoj podskupini broj ispitanica je malen (12). U navedenom istraživanju u kojem je također rađena imunohistokemijska ekspresija CD4+ i CD8+ limfocita, uključene su trudnice s VUE i PE, ali u malom broju (N=7), a preko 70% je imalo pridružen IUZR nejasne etiologije, kako je navedeno u radu. Medijan porođajne mase je bio 520 grama veći nego u našem (12). Sve su to mogući epidemiološki razlozi pronađenim razlikama. U tom istraživanju veća je pojavnost CD8+ limfocita u odnosu na CD4+ limfocite.

Moguća objašnjenja rezultata o pojačanoj ekspresiji CD4+ limfocita u žena s VUE i PE u ovom istraživanju su da postoje dvije potpuno različite forme PE (rana i kasna) s različitim biokemijskim, kliničkim i patološkim značajkama pri čemu je rana neizostavno povezana s poremećajima placentacije i posljedično IUZR (39,40). Ova studija ne uključuje teški oblik PE u kojih je placentacija više poremećena što je vidljivo i iz toga što nema razlike u porođajnoj masi između VUE s PE i VUE bez PE. Uglavnom se radi o kasnom obliku PE. Nisu bile istraživane i druge subpopulacije T pomagačkih limfocita koji su možebitno uključene u imunologiju PE.

Analiziranjem T reg limfocita u ovoj studiji koji iskazuju markere CD4+CD25+FOXP3+, a koji su proučavani u smislu prisutnosti i broja u žarištima VUE istraživanih posteljica, pronađeni su pojedinačno i oskudno i bez statistički značajne razlike između ispitivanih skupina. U radu Katzman i sur. iz 2011. pronađen je povećan relativan broj T reg limfocita u žarištima vilitisa u odnosu na kontrolnu skupinu bez vilitisa. Radilo se o malom broju posteljica i nije bila prisutna PE, iako je upitno kako uopće uspoređivati broj T reg limfocita u žarištu vilitisa s brojem T reg limfocita u posteljici bez vilitisa (28).

Prirodnoubojičke NK stanice koje su CD56+, a koje su analizirane u decidui posteljica s VUE s PE i VUE bez PE i uspoređivane s kontrolnom skupinom posteljica urednih trudnoća, pronađene su oskudno i bez statistički značajne razlike između skupina. T reg limfociti koji su također analizirani u decidui istih posteljica nisu pronađeni.

Trudnoća je stanje karakterizirano interakcijom između majke i fetusa. Pola genetskog materijala ima očevo porijeklo pa stoga fetus predstavlja polualograft. U cilju zaštite fetusa od strane majčinog imunološkog odgovora, trudnoća uključuje blagu sistemsku upalu i imunosupresiju. Ljudska posteljica predstavlja anatomsku i funkcionalnu feto-maternalnu barijeru i aktivno stvara i luči različite imunomodulatorne faktore koji preveniraju

odbacivanje histokompatibilnog fetusa od strane majčinog imunološkog sistema, a T reg limfociti igraju značajnu ulogu u majčinoj toleranciji fetalnih antigena (41).

T stanice su važan dio imunološkog sustava i igraju centralnu ulogu u imunoregulaciji i imunostimulaciji i u VUE i u PE i mogu se klasificirati po površinskim markerima na CD4+ i CD8+ (42). CD4+ se diferenciraju u Th1 stanice koje su odgovorne za stanični imunitet, Th2 stanice koje su odgovorne za humoralni imunitet, Th17 koje djeluju proupalno i T reg stanice koje su odgovorne za indukciju tolerancije, a sve ovisno o produkciji citokina čija je ravnoteža u određenom mikrookolišu neophodna za uspješnu trudnoću (43). Očigledno je da CD4+ limfociti kao dio imunološkog sustava igraju važnu ulogu bilo u započinjanju, bilo u održavanju različitog imunog odgovora i u VUE i u PE (44,45). Najnovije su identificirani Th 17 limfociti također kao subpopulacija CD4+ limfocita, a bazirano na njihovoj mogućnosti da luče IL17 i uzrokuju upalnu i tkivnu destrukciju (31,32). Kombinacija citokina koji stimuliraju razvoj humanih Th17 predmet je rasprava. Objavljeno je više radova u kojima je u preeklampsiji uočen smanjen broj T reg limfocita, a povišena populacija Th17 kao podvrsta CD4+ limfocita u perifernoj krvi u odnosu na stanje izvan trudnoće (44,46-49). Povećan broj Th17 stanica može inducirati jaku sistemsku upalnu reakciju i uzrokovati poremećaj funkcije T reg limfocita što bi sve zajedno moglo pojasniti patofiziologiju PE (49).

Majčinski T limfociti tijekom trudnoće ulaze u stanje privremene tolerancije stranih antigena što je davno dokazano pokusima na miševima (50). Točan mehanizam kojim se ostvaruje ova privremena tolerancija nije jasan. Klasično se funkcija i disfunkcija imunološkog sustava u žene svodi na Th1/Th2 paradigmu. Novije studije šire Th1/Th2 paradigmu u Th1/Th2/Th17 i T reg paradigmu gdje su T reg limfociti mogući regulatori Th17 limfocita i ostalih stanica imunološkog sustava koji su uključeni u majčinu intoleranciju fetusa (50,51). U trudnica je pojačana produkcija IL4, IL5, IL6, a posebno IL10 koji se smatra najznačajnijim za utjecaj na Th1/Th2 paradigmu koja se javlja u trudnoći. Mogući mehanizmi za to su pojačana proizvodnja estrogena iz posteljice koji onda potiču stvaranje one subopulacije T limfocita koji luče IL10 kao i ostale IL (52). Drugi predloženi mehanizmi su proizvodnja TGF-β, smanjenje triptofana preko 2,3-indolamin dioksigenaze ili međudjelovanjem s FAS ligandom i s TNF povezanim s apoptozom inducirajućim faktorom koji se nalazi na trofoblastu (53-55).

Sve više se spominje uloga mezenhimalnih stem stanica (MSC) koje su zapravo multipotentne stromalne stanice koje se mogu pronaći u skoro svim tkivima čovjeka, a kao posebna podvrsta se spominju endometralne mezenhimalne stem stanice (eMSC). Novije

studije opisuju utjecaj MSC stanica na imunološke i upalne odgovore, posebno u endometriju gdje bi mogle imati ključnu ulogu u imunološkoj regulaciji neophodnoj za uspješnu implantaciju i placentaciju. Abnormalna funkcija ovih stanica može dovesti do poremećenog razvoja trofoblasta i poremećene placentacije. Također MSC stanice mogu mijenjati lučenje citokina i time pospješiti tolerirajući mikrookoliš. Posebno stimuliraju produkciju IL10 koji onda inducira sekreciju protuupalnog citokina IL4 od strane Th2 stanica (56,57).

VUE kao upalna lezija posteljice karakterizirana je infiltracijom predominantno majčinih CD4+ i CD8+ leukocita u korionske resice, ali subpopulacije tih stanica još nisu istražene (58,20). Subpopulacije, prvenstveno CD4+ su nepoznanica kako u žarištima VUE tako i u PE. Warning i sur. smatraju da u normalnoj trudnoći trofoblast uzrokuje majčinu toleranciju na plod putem komadića trofoblasta koji dolaze u majčinu cirkulaciju gdje uzrokuju sistemski odgovor i proliferaciju T reg limfocita, koji osiguravaju njen normalan tijek (20).

Najčešći ishod trudnoća s vilitisom u posteljici je uredan (59). Postoje studije koje sugeriraju da VUE nije samo benigna posteljična lezija već da je povezana s različitim lošim ishodima kao što su mrtvorođenost, intrauterini zastoj u rastu, neurološki poremećaj (6,10,59,60). Analiza povezanosti PE kao jednog od najvažnijih poremećaja u trudnoći i VUE u ovom radu ukazuje na značajan udio CD4+ limfocita u posteljicama s VUE iz trudnoća kompliciranih PE, ali i na neophodnost poznavanja cjelokupne subpopulacije.

U zaključku, ova studija je pokazala da su upalne stanice u žarištima vilitisa CD3+, CD4+, CD8+, CD45LCA i CD68+, te je potvrdila dosadašnja istraživanja da se upalni infiltrat u VUE sastoji od predominantno CD4+, CD8+ limfocita, kao i CD68+ makrofaga. Pokazala je da je broj CD4+ limfocita, broj resica infiltriranih s CD4+ limfocitima, kao i broj CD4+ limfocita u decidui statistički značajnije veći u posteljicama s VUE i PE u odnosu na posteljice s VUE bez PE i kontrole. Ostale upalne stanice nisu pokazale značajnu razliku u broju u žarištima vilitisa, ni u broju zahvaćenih resica, a niti u broju u decidui bazalis između ispitivanih skupina. Također je pokazala da su T reg limfociti u žarištima vilitisa pronađeni pojedinačno i oskudno i bez statistički značajne razlike između ispitivanih skupina. Prirodnoubojičke NK stanice koje su analizirane u decidui bazalis nisu se pokazale značajne ni u jednoj skupini. Je li PE koja je ovdje pridružena VUE u žena povezana s promjenama u broju ili funkciji NK stanica još treba biti utvrđeno (61). T reg limfociti nisu se također pokazali značajnim ni u jednoj skupini. Nije pronađena statistički značajna razlika između broja žarišta i stupnja VUE između posteljica s

VUE s i bez PE. U nekom od slijedećih radova trebalo bi napraviti istraživanje na većem uzorku VUE s PE, uz analizu cjelokupne subpopulacije CD4+ limfocita, te paralelnu analizu subpopulacija CD4+ limfocita iz periferne krvi istih trudnica, a koji vjerovatno pridonose upalnom odgovoru i simptomima PE i važni su za razumijevanje ovih zanimljivih upalnih lezija ljudske posteljice. Fiziologija imune interakcije između fetusa i majke za vrijeme trudnoće je još uvijek neistraženo područje koje sve više zaokuplja interes istraživača. Upravo razumijevanje imunološke interakcije za vrijeme normalne trudnoće moglo bi pripomoći istraživanju poremećaja povezanih s trudnoćom kao što je PE, a što bi u krajnjoj liniji pomoglo u pronalaženju adekvatne terapije.

6 ZAKLJUČCI

1. Upalne stanice koje se nalaze u žarištima vilitisa su CD3+, CD4+, CD8+, CD45LCA, CD68+. Broj CD4+ limfocita, broj resica infiltriranih s CD4+ limfocitima, omjer CD4+/CD8+ kao i broj CD4+ limfocita u decidui statistički je značajnije veći u posteljicama s VUE i PE u odnosu na posteljice s VUE bez PE i kontrolnu skupinu. Ostale upalne stanice nisu pokazale značajne razlike u broju u žarištima vilitisa, ni u broju zahvaćenih resica, a niti u broju u decidui između ispitivanih skupina. T regulacijski limfociti koji iskazuju markere CD4+CD25+FOXP3+, a koji su analizirani u smislu prisutnosti i broja u žarištima VUE istraživanih posteljica, pronađeni su pojedinačno i oskudno i bez značajne razlike između ispitivanih skupina.

2. Prirodnoubojičke NK stanice koje su CD56+, kao i T reg limfociti koje su analizirane u decidui ispitivanih posteljica nisu se pokazali značajnim ni u jednoj skupini.

3. Nije pronađena statistički značajna razlika između broja žarišta i stupnja VUE između VUE s i bez PE.

7 SAŽETAK

Cilj: Istražiti i odrediti broj i vrstu T limfocitnog infiltrata kao i broj T reg limfocita u žarištima VUE posteljica trudnoća kompliciranih PE i usporediti ih s brojem u posteljicama s VUE bez PE. Istražiti i odrediti broj T reg limfocita i NK stanica u decidui bazalis posteljica s VUE s i bez PE i kontrolne skupine urednih trudnoća te ih međusobno usporediti. Istražiti stupanj i žarišta VUE u posteljicama trudnoća kompliciranih PE i usporediti ih sa stupnjem i žarištima VUE u posteljicama trudnoća bez PE.

Materijali i metode: Ispitivane skupine čine 27 posteljica s VUE iz trudnoća kompliciranih PE i 27 posteljica s nalazom VUE iz trudnoća bez PE, te 20 posteljica iz urednih trudnoća. Klinička dijagnoza PE postavljena je prema strogim kriterijima arterijske hipertenzije i proteinurije, a dijagnoza VUE prema prisutnosti limfohistiocitnog infiltrata koji je zahvaćao različitu proporciju posteljičnih resica. Broj i vrsta T limfocitnog infiltrata u žarištima VUE kao i broj T reg i NK stanica u decidui bazalis određeni su imunohistokemijskom uporabom specifičnih antitijela: CD3, CD4, CD25, FOXP3, CD8, CD45LCA, CD68 i CD56. Određivani su i broj žarišta i stupanj VUE.

Rezultati: Nije bilo statistički značajne razlike u smislu broja žarišta i stupnja VUE između skupine s VUE i PE i VUE bez PE. Nije nađena statistički značajna razlika u smislu pariteta, majčinih godina, porođajne mase djece, dužine djece i gestacijske dobi između navedenih skupina, ali je pronađena statistički značajna razlika u porođajnoj masi i gestacijskoj dobi između skupina VUE s i bez PE i kontrolne skupine. Analiza broja T limfocita između skupina s VUE s i bez PE ukazala je na statistički značajnu razliku u ukupnom broju CD4+ limfocita, broju resica infiltriranih s CD4+ limfocitima te omjeru CD4+/CD8+ u skupini s VUE i PE u odnosu na skupinu s VUE bez PE. Nije uočena statistički značajna razlika ukupnog broja i vrste upalnih stanica, niti broja zahvaćenih resica ispitivanih posteljica infiltriranih s CD3, CD8, CD25, FOXP3, CD45LCA i CD68. Analiza T reg limfocita i NK stanica u decidui u posteljicama s VUE s i bez PE te urednih trudnoća ukazala je na statistički značajne razlike u broju CD4+ limfocita između skupina s VUE s i bez PE, te s VUE i PE i kontrole. Nije bilo statistički značajne razlike između skupine s VUE bez PE i kontrole. CD25+ i FOXP3+ bili su negativni. Nismo dokazali statistički značajnu razliku u broju NK stanica između ispitivanih skupina.

Zaključak: T reg limfociti koji iskazuju markere CD4+CD25+FOXP3+, a koji su analizirani u smislu prisutnosti i upliva u žarištima VUE istraživanih posteljica, kao i decidui, pronađeni su pojedinačno i oskudno i bez statistički značajne razlike između ispitivanih skupina. Prirodnoubojičke stanice koje su CD56+, a koje smo analizirali u decidui ispitivanih posteljica nisu se pokazale značajnim ni u jednoj skupini. Žarišta vilitisa posteljica s VUE iz trudnoća kompliciranih PE imaju statistički značajnije veći broj CD4 + limfocita, kao i CD4+/CD8+ omjer nego posteljice s VUE bez PE. Slijedeće istraživanje trebalo bi napraviti na većem uzorku posteljica s VUE i PE, uz analizu cjelokupne subpopulacije CD4+ limfocita, te paralelnu analizu subpopulacije CD4+ limfocita iz periferne krvi istih trudnica, a koji vjerovatno pridonose upalnom odgovoru i simptomima PE. Fiziologija imune interakcije između fetusa i majke za vrijeme trudnoće je još uvijek neistraženo područje koje sve više zaokuplja interes istraživača. Upravo razumijevanje imunološke interakcije za vrijeme normalne trudnoće moglo bi pripomoći istraživanju poremećaja povezanih sa trudnoćom kao što je PE.

8 SUMMARY

T REGULATORY LYMPHOCYTES AND NK CELLS IN THE PLACENTAE WITH VILLITIS OF UNKNOWN ETIOLOGY FROM THE PREGNANCIES COMPLICATED WITH PREECLAMPSIA

Objective: To compare immunohistochemical expression of different T type lymphocytes as well as T reg lymphocytes in foci of VUE in placentae from pregnancies complicated with PE and in foci of VUE in placentae without PE. To compare immunohistochemical expression of T reg lymphocytes and NK cells in the basal decidua, in placentae with VUE from pregnancies with and without PE and from normal pregnancies. To compare grade and number of foci between VUE in placentae from pregnancies complicated with PE and in placentae from pregnancies without PE.

Material and methods: Fiftyfour placentae were collected from pregnancies who had villitis of unknown etiology with [N=27] and without [N=27] preeclampsia and twenty [N=20] from normal pregnancies. Clinical diagnosis of PE was made according to the strict criteria of hypertension and proteinuria, and diagnosis of VUE according to the presence of lymphohistiocytic infiltrate affecting varying proportions of the villous tree of the placenta. Immunohistochemistry for the number and type of T cell inflammatory infiltrate in VUE foci as well as T reg and NK cells in basal decidua was performed on formalin fixed and paraffin-embedded sections by use of the CD3, CD4, FOXP3, CD25, CD8, CD45, CD56 and CD68 antibodies. Cytomorphological characteristics of examined placentas were determined by the number of foci and grade of VUE.

Results: There was no statistical difference in terms of foci and grade of VUE between VUE with and without PE. Also, there was no statistical difference in terms of parity, maternal age, birth weight, birth length and gestational age, but there was a statistical difference in terms of birth weight and gestational age between VUE with and without PE and control group. There was statistically significant difference in total CD4+ lymphocytes count, number of villi infiltrate with CD4+ lymphocytes and CD4+/CD8+ ratio between VUE with and without PE. No statistically significant difference of the total number and type of inflammatory cells and number of villi infiltrated with CD3, CD8, CD25, FOXP3, CD45 and CD68 between the study groups was detected. Analysis of T reg and NK cells infiltrate in the basal decidua

among all three investigated groups revealed statistically significant difference in total CD4+ lymphocytes count between group with VUE with and without PE and with VUE with PE and control group. There was no statistically significant difference between group with VUE without PE and control group. CD25+ i FOXP3+ were negative. No statistically significant difference of the total number of decidual CD56 cells in basal decidua between the study groups was noticed.

Conclusion: T reg lymphocytes expressing the CD4+, CD25+ and FOXP3+ markers were analysed for their presence and influx in VUE foci in the placentae, and were detected individually and rarely, without statistically significant between-group difference, also in decidua. Natural killer cells which were analysed in decidua were detected also individually and rarely without statistically significant between group difference. This study results revealed statistically significantly larger CD4+ T lymphocyte population and CD4+/CD8+ ratio in placentae with VUE with PE compared to VUE without PE. Future studies should include a greater sample of VUE and PE and focus on analysis of the overall CD4+ lymphocyte subpopulation and concurrent analysis of CD4+ lymphocyte subpopulation from peripheral blood collected from the same pregnant women, as these cells probably contribute to the inflammatory response and symptoms of PE, while also being relevant for proper understanding of these intriguing inflammatory lesions of human placenta. The physiology of the immune interaction between the fetus and the mother during pregnancy is an unexplored field that has received increasing attention during the past years. The understanding of immune interactions during normal pregnancy could help guide the research of pregnancy-associated disorders such as PE what would finally allow the development of effective therapeutic tools.

9 LITERATURA

1. Sadler TW. Second week of development: Bilaminar germ disc. Ur: Sadler TW. Langman's medical Embriology, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins 2010:47.

2. Kos M. Razvoj i građa posteljice. Ur: Kos M, Leniček T: Osnove patologije posteljice, Zagreb, Medicinska naklada 2011.

3. Benirschke K. Microscopic survey. Ur: Bernischke K, Kaufmann P, Baergen NR. Pathology of the human placenta, Berlin, Springer 2006:16.

4. Fox H, Sebire NJ. Physiology of the placenta. Ur: Fox H: Pathology of the placenta, Philadelphia, Saunders 2007:57.

5. Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JC. Apoptosis and its role in the trophoblast. Am J Obstet Gynecol 2006;195:29-39.

6. Redline RW, Patterson P. Villitis of unknown etiology: noninfectious chronic villitis in the placenta. Hum Pathol 2007;38:1439-1446.

7. Knox WF, Fox H. Villitis of unknown etiology: Its incidence and significance in placentae from a British population. Placenta 1984;5:395-402.

8. Russell P. Inflamatory lesions of the human placenta. Placenta 1980;1:227-244.

9. Labarrere C, Althabe O, Telenta M. Chronic villitis of unknown etiology in placentae of idiopathic small for gestational infants. Placenta 1982;3(3):309-17.

10. Derricott H, Jones RI, Haezel AE. Investigating the association of villitis of unknown etiology with stillbirth and fetal growth restriction - a systematic review. Placenta 2013;34:856-862.

11. Kim JS, Romero R, Kim MR, et al. Involvement of Hofbauer cells and maternal T cells in villitis of unknown aetiology. Histopathology 2008;52:457-464.

12. Katzman PJ. Chronic inflammatory lesions of the placenta. Semin Perinatol 2015;39:20-26.

13. Myerson D, Parkin RK, Benirschke K, et al. The pathogenesis of villitis of unknown etiology: analysis with a new conjoint immunohistochemistry-in situ hybridization procedure to identify specific maternal and fetal cells. Pediatr Dev Pathol 2006;9:257-265.

14. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D. Stanice, tkiva i organi imunosnog sustava. Imunologija 2010;2:21-41.

15. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijenborg R. Preeclampsia. Lancet 2010;376:631-644.

16. Ilkis JV, Reddy UM, Roberts JM. Preeclampsia-a pressing problem: an executive summary of a National Institute of a Child Health and Human Development workshop. Reprod Sci 2007;14:508-523.

17. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CWG. Immunoregulation in normal pregnancy and preeclampsia; an overview. Reprod Biomed Online 2006;13:680-686.

18. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunological self-tolerance and negative controlof immune responses. Ann Rev Immunol 2004;22:531-562.

19. Gil Mor: Imunology of Pregnancy: Varuna R, Aluvihare and Alexander G. Betz: The role of regulatory T cells in materno-fetal tolerance. 2006:171-176.

20. Warning JC, Mc Cracken SA and Morris JM. A balancing act: mechanisms by wich the fetus avoids rejection by the maternal immune system. Reproduction June 1, 2011;141:715-724.

21. Myatt L, Roberts JM. Preeclampsia: Syndrome or Disease? Curr Hypertens Rep 2015;17:83.

22. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. Hypertension 2008;51:970-975.

23. Trowsdale J, Betz AG. Mother litlle helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. Nat Immunol 2006;7:241-246.

24. Mold JE, Michaelsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, Lee TH, Nixon DF, Mccune JM. Maternal alloantigens promote the development of tollerogenic fetal regulatory T cells in utero. Science 2008;322:1562-1565.

25. Keelan JA, Mitchell MD. Placental cytokines and preeclampsia. Front Biosci 2007;12:2706-27.

26. Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, Padbury J, Sharma S. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. J Immunol 2000;164:5721-8.

27. Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, Nakashima A, Shima T, Ito M. Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in feto-maternal tolerance. Semin Immunopathol 2007;29:115-122.

28. Philip J. Katzman, Shawn P. Murphy, and Darryl A. Oble. Immunohistochemical analysis reveals an influx of regulatory T cells and focal trophoblactic STAT-1 phosphorylation in chronic villitis of unknown etiology. Pediatric and Developmental Pathology 2011;14:284-293.

29. Moffet A and Colucci F. Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. J.Clin. Invest. 2014;124:1872-1879.

30. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D. Međudjelovanje imunosnih stanica. Imunologija 2010;11:202-205.

31. Steinborn A, Haensch GM, Mahnke K, et al. Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia? Clin Immunol 2008;129:401–12.

32. Fischer A. Human immunodeficiency: connecting STAT3, Th17 and human mucosal immunity. Immunol Cell Biol 2008;86: 549–51.

33. Bonett DG, Price RM. Statistical inference for a linear function of medians: confidence intervals, hypothesis testing, and sample size requirements. Psychol Methods 2002;7:370-383.

34. Ramma W, Ahmed A. Is inflamation the cause of preeclampsia? Biochem Soc Trans 2011;39:1619-27.

35. Redline RW, Patterson P. Villitis of unknown etiology is associated with major infiltration of fetal tissue by maternal inflammatory cells. Am J Pathol 1993;143:473-479.

36. Labarrere CA, Faulk WP. MHC class II reactivity of human villous trophoblast in chronic inflammation of unestablished etiology. Transplantation 1990;50:812–16.

37. Brito H, Juliano P, Altemani C, Altemani A. Is the immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate helpful in distinguishing villitis of unknown etiology from non-specific infection villitis? Placenta 2005;26:839–41.

38. Kapur P, Rakheja D, Gomez AM, et al. Characterization of inflammation in syphilitic villitis and in villitis of unknown etiology. Pediatr Dev Pathol 2004;7:453–8.

39. Scazzocchio E, Figueras F. Contemporary prediction of preeclampsia. Curr Opin Obstet Gynecol 2011;23:65–71.

40. Czeizel AE, Banhidy F. Chronic hypertension in pregnancy. Curr Opin Obstet Gynecol 2011;23:76–81.

41. Zenclussen AC, Grrlof K, Zenclussen ML, et al. Abnormal T cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. Am J Pathol 2005;166:811-822.

42. Toldi G, Vasarhelyi ZE, Rigo J JR, Orban C, Tamassy Z, Bajnok A, et al. Prevalence of Regulatory T-Cell Subtypes in Preeclampsia. Am J Reprod Immunol 2015;74:110-115.

43. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. Am J Reprod Immunol 2010;63:601–10.

44. Hafeez NA, Fouda M, Abdel Gawad ER, et al. The role of regulatory T cells in preeclampsia. Egypt J Immunol 2014;21:45–55.

45. Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational mini review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. Clin Exp Immunol 2010;159: 109–19.

46. Littman DR, Rudensky AY. Review Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. Cell 2010;140(6):845-858.

47. Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, et al. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. J Immunol 2009;183:7023–30.

48. Darmochwal-Kolarz D, Saito S, Tabarkiewicz J, et. al. Apoptosis signaling is altered in CD4+CD25+FOXP3+ T regulatory lymphocytes in preeclampsia. Int J Mol Sci 2012;13(6):6548-6560.

49. Darmochwal-Kolarz D, Kludka-Sternik M, Tabarkiewicz J, et al. The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia. J Reprod Immunol 2012;93:75–81.

50. Saito S. Th17 cells and regulatory T cells: new light on pathophysiology of preeclampsia. Immunol Cell Biol 2010;88:615–17.

51. Laresgoiti-Servitje E, Gomez-Lopez N, Olson DM. An immunological insight into the origins of pre-eclampsia. Hum Reprod Update 2010;16:510–24.

52. Polanczyk MJ, Carson BD, Subramanian S, et al. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. J Immunol 2004;173:2227–30.

53. Phillips TA, Ni J, Pan G, et al. TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. J Immunol 1999;162:6053–9.

54. Mellor AL, Sivakumar J, Chandler P, et al. Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. Nat Immunol 2001;2:64–8.

55. Hunt JS, Vassmer D, Ferguson TA, Miller L. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. J Immunol 1997;158:4122–8.

56. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood 2005;105:1815–22.

57. Bifari F, Lisi V, Mimiola E, et al. Immune modulation by mesenchymal stem cells. Transfus Med Hemother 2008;35:194–204.

58. Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, et al. Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. J Immunol 2004;172:7393–8.

59. Becroft DM, Thompson JM, Mitchell EA. Placental villitis of unknown origin: epidemiologic associations. Am J Obstet Gynecol 2005;192(1):264-71.

60. Redline RW, Wilson-Costello D, Borawski E, Fanaroff AA, Hack M. Placental lesions associated with neurologic impairment and cerebral palsy in very low-birth-weight infants. Arch Pathol Lab Med 2000;122:1785-91.

61. Acar N, Ustunel I, Demir R. Uterine natural killer (uNK) cells and their mission during pregnancy: a review. Acta Histochem 2011;113:82-91.

10 ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Sandra Benzon

Adresa: Klinika za ženske bolesti i porode, KBC Split

Spinčićeva 1, 21000 Split

Tel 021 551-453; Mob 0915477335

E-mail: sbenzon68@gmail.com

Rođena: 15.03.1968. u Splitu

Obrazovanje:

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu - Studij u Splitu (1992)

Specijalistički ispit iz ginekologije i porodništva - KBC Zagreb (2008)

Subspecijalizacija iz fetalne medicine i opstetricije (2016)

Zaposlenje:

Dom zdravlja Omiš (1993-2002)

Klinika za ženske bolesti i porode, KBC Split (2002-)

Akademski stupnjevi i napredovanje:

Završen poslijediplomski doktorski studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu

Znanstveno nastavno napredovanje:

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

Sudjelovanje u nastavi:

Dodiplomska nastava – asistent na Katedri za ginekologiju i porodništvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu

Publiciranje:

Radovi objavljeni u CC indeksiranim časopisima:

1. Benzon S, Zekić-Tomaš S, Benzon Z, Vulić M, Kuzmić-Prusac I. Involvment of T lymphocytes in the placentae with villitis of unknown etiology from pregnancies complicated with preeclampsia. J Matern Fetal Neonatal 2016;29(7)1055-60.

2. Benzon Z, Benzon S, Tomaš SZ, Prusac IK, Vulić L, Vulić M, Stefanovic V. Immunohistochemical demonstration of RECK protein and interleukin-6 in fetal membranes from singleton pregnancies with late preterm delivery, intact membranes and histological chorioamnionitis. Biotech Histochem 2018;19:1-6. (equal contribution)

Radovi objavljeni u non CC indeksiranim časopisima:

1**.** Pušić TV, Roje D, Šain M, Benzon S, Benzon Z, Radić J. The overview of four patient with postpartal hemolytic-uremic syndrom. Gynaecol Perinatol 2013;22(3):157-159.
2. Vulić M, Meštrović Z, Roje D, Tadin I, Benzon S, Rešić J. Is hystory indicated cerclage justified? Gynaecol Perinatol 2013;19:S16-S19.

Sažeci objavljeni u non CC indeksiranim radovima:

1. Benzon S, Vulić M, Marušić J, Roje D, Kopić D, Zeljak M. Primjena rekombinantnog aktiviranog čimbenika VII kod poslijeporođajnog krvarenja. Gynaecol Perinatol 2010;19:126.
2. Karelović D, Tadin I, Strinić T, Vidović S, Vrdoljak E, Kosović I, Marušić J, Benzon S, Meštrović Z, Branica D. Rak endometrija u Klinici za ženske bolesti i porode KB Split, Gynaecol et Perinatol 2004;13:131.
3. Benzon S, Vulić M, Benzon Z, Roje D, Vukušić-Pušić T. Instrumentalno dovršenje poroda vaginalnim putem u KBC Split u dvogodišnjem razdoblju; naša iskustva. Gynaecol et Perinatol 2013;22:97.
4. Benzon S, Benzon Z, Vulić M. Utječe li preeklampsija u trudnoćama s VUE na morbiditet novorođenčadi? Gynaecol et Perinatol 2015;24:80.

Strani jezici:

Engleski (aktivno), talijanski (pasivno)