

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

**MARTINA VUKOJA**

**IZRAŽAJ GRANZIMA K, FAS LIGANDA I INTERFERONA GAMA U  
POSTELJICAMA ŽENA S PREEKLAMPSIJOM**

**Doktorski rad**

**Split, 2026.**

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

**MARTINA VUKOJA**

**IZRAŽAJ GRANZIMA K, FAS LIGANDA I INTERFERONA GAMA U  
POSTELJICAMA ŽENA S PREEKLAMPSIJOM**

**Doktorski rad**

**Split, 2026.**

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za morfologiju pri Katedri za histologiju i embriologiju čovjeka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Mostaru uz suradnju sa Zavodom za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu te Kliničkim zavodom za patologiju, citologiju i sudsku medicinu Sveučilišne kliničke bolnice Mostar uz mentorstvo prof. dr.sc. Violete Šoljić, dr. med.

**Objavljeni znanstveni rad na kojem se temelji doktorski rad:**

1. **Martina Vukoja**, Marina Ćurlin, Katarina Vukojević, Nevenka Jelić-Knezović, Anita Kolobarić, Martina Orlović Vlaho i Violeta Šoljić, 2024. Effect of Granzyme K, FasL and Interferon- $\gamma$  Expression in Placentas with Preeclampsia

Biomedicines 2024, 12, 842. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12040842> (Čimbenika odjeka 4.7)

.

## **ZAHVALE:**

*Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Violeti Šoljić, koja mi je nesebično pomagala prilikom izrade ovog doktorskog rada, koja je sa mnom prolazila svaki korak izrade istraživanja i pisanja znanstvenih članaka. Hvala Vam na svakoj ohrabrujućoj riječi, pa i ponekada strogoj, ali uvijek u svrhu moga boljeg rada i izgradnje kao osobe i znanstvenice. Uz prof. Vukojević mogu reći da ste vi moje „ znanstvene majke“ i hvala Vam na tome.*

*Veliko hvala i prof. dr. sc. Katarini Vukojević koja je uvijek bila tu kao snaga poticaja i ohrabrenja te izvor strogoće koja je rezultirala mojim većim predanjem za izradu rada i unapređivanju znanja i vještina koje će mi uvijek biti od koristi u mom profesionalnom, ali i osobnom životu.*

*Zahvala ide i mojim profesorima s Fakulteta prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti Sveučilišta u Mostaru, studija Biologije i Kemije, koji su prvi prepoznali moju želju i potencijal za rad sa studentima i u znanosti. Bili su prvi poticaj za moje obrazovanje i rad.*

*Neizmjerne hvala ide mojim roditeljima tati Anđelku i mami Ružici te sestri Klari koji su bili i još uvijek jesu kamen temeljac moje osobnosti, želja i htijenja. Hvala na svakom ohrabrenju, svoj ljubavi i miru koji ste mi pružili.*

*Neizmjerne zahvala mom suprugu Peri koji je zajedno sa mnom vodio, često naizgled, nemoguće akademske bitke, ali koje smo zajedno premostili. Hvala za svaku riječ ohrabrenja, za svu pomoć i najviše hvala za ljubav iskazanu tijekom ovog mojeg akademskog procesa.*

*Možda još uvijek ne shvaćaju, znati će jednog dana i zbog toga hvala i mojim sinovima Valentinu i Tomislavu koji su bili tu tijekom upisa, studiranja i pisanja rada i hvala im što su bili divna djeca koja su „dopustila“ mami da završi rad.*

*Hvala mojoj baki Mariji na svakoj izmoljenoj krunici i svakom postu koji je činila za mene kako bi uz Božju pomoć postigla sve svoje osobne i akademske uspjehe.*

# SADRŽAJ

## Sadržaj

POPIS OZNAKA I KRATICA .....	1
1. UVOD .....	3
1.1. Preeklampsija (PE) .....	5
1.2. Razvoj trofoblasta.....	6
1.3. Nastanak resičastog koriona i decidue basalis.....	9
1.4. Posteljica.....	9
1.5. Patogeneza PE .....	10
1.6. Prirodnoubilačke stanice.....	12
1.7 T stanice.....	14
1.8 Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) .....	16
1.9 Granzim K (GZMK).....	17
1.10 Fas ligand (FasL).....	18
2. Ciljevi i hipoteza istraživanja.....	19
3. Materijali i metode .....	22
3.1 Biološki materijal .....	23
3.2 Postupci .....	24
3.2.1 Priprema FFPE tkiva.....	24
3.2.2 Bojanje hematoksin-eozinom .....	25
3.2.3 Dvostruka imunofluorescencija .....	25
3.2 Obrada mikrofotografija .....	27
3.3 RNK izolacija i Real Time qPCR.....	27
3.4 Priprema svježeg uzorka posteljice za test citotoksičnosti.....	28
3.5 Test citotoksičnosti .....	32
3.6 Statistički postupci.....	34
4. Rezultati .....	36

5. Rasprava .....	51
7. Sažetak .....	61
8. Laički sažetak .....	64
9. Summary .....	66
10. Lay summary .....	69
11. Literatura .....	71
12. Životopis.....	78

## POPIS OZNAKA I KRATICA

7-AAD- boja za detekciju stanične smrti (*engl.* 7-Aminoactinomycin D)

ACOG – *engl.* American College of Obstetricians and Gynecologists

BMI – indeks tjelesne mase

CM- *engl.* Central Memory

CTB – citotrofoblast

CTL- citotoksični T limfociti(*engl.* Cytotoxic T Lymphocytes)

CO<sub>2</sub> – ugljikov (IV) oksid

DS – decidualna stanica

E – efektorna stanica

EM – efektorske memorijske stanice(*engl.* Effector Memory cells)

EVTB – izvanresičasti trofoblast

FFPE – tkivo fiksirano u formalinu i uklopljeno u parafinu

FCS – Fetalni goveđi serum (*engl.* Fetal Calf Serum)

DAPI – boja za bojanje jezgri (*engl.* 4',6-diamidino-2-phenylindole)

HELLP sindrom – sindrom hemolize, povišenih jetrenih enzima i trombocitopenije (*engl.* hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count)

HE- hematoksilin-eozin bojanje

IL – interleukin

IUZR – intrauterini zastoj rasta

MHC – *engl.* Major Histocompatibility Complex

MHC-I – *engl.* Major Histocompatibility Complex Class I

MgCl<sub>2</sub> – magnezijev (II) klorid

mmHg – milimetar živinog stupca

M<sub>2</sub> – stanična smrt

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (*engl.* messenger RNA)

N – *engl.* Naive T cell

NK stanice – *engl.* Natural Killer Cells

PE – preeklampsija

R1 – ciljne stanice

R2 – efektorne stanice

s Fas – topljivi oblik Fas receptora

s FasL – topljivi oblik Fas liganda

SČ – sincicijski čvorići

STB – sinciciotrofoblast

T reg – regulatorske T stanice

TB – trofoblast

TNF-R - *engl.* Tumor Necrosis Receptor

TNF- $\alpha$  – *engl.* Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

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

VTB – resičasti trofoblast

WHO – svjetska zdravstvena organizacija (*engl.* World Health Organisation)

## **1. UVOD**

U uvodu će biti prikazani osnovni mehanizmi nastanka preeklampsije kao patološkog stanja u trudnoći te će se obraditi nastanak trofoblasta i stanica koje stvara trofoblast, koje su važne za patogenezu preeklampsije. Također će biti opisane stanice imunološkog sustava koje sudjeluju u najvažnijim procesima invazije trofoblasta te modeliranja krvnih žila majke. Poseban naglasak stavio se na citotoksične granule koje su uključene u procese djelovanja trofoblasta i stanica koje se diferenciraju iz trofoblasta tijekom trudnoće.

## 1.1. Preeklampsija (PE)

Preeklampsija (PE) je kompleksna multisistemska bolest koja uključuje angiogenetske, metaboličke, imunološke i genetičke čimbenike. Dijagnosticira se pojavom iznenadne hipertenzije nakon 20. tjedna trudnoće s pojavom proteinurije, disfunkcijom majčinih organa ili disfunkcijom posteljice (1, 2). Preeklampsija je bolest koja pogađa 2-8% trudnoća te se smatra vodećim uzrokom smrtnosti majke i fetusa (3). U patofiziologiji PE ključnu ulogu imaju abnormalnosti u razvoju i funkciji posteljice, posebice trofoblasta i remodeliranje spiralnih arterija maternice. Prema klasifikaciji Američkog kongresa opstetričara i ginekologa (*engl.* American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG), preeklampsija predstavlja jedan od tipova hipertenzivnih poremećaja u trudnoći. Danas se PE definira kao pojava povišenog krvnog tlaka, sistoličkog iznad 140 mm Hg i/ili dijastoličkog iznad 90 mm Hg udruženog s proteinurijom većom od 300 mg u 24 sata. U tablici 1. navedeni su dijagnostički kriteriji za hipertenzivne poremećaje u trudnoći. Ovi se znakovi pojavljuju nakon 20. tjedna gestacije kod žena koje su prije trudnoće imale uredan krvni tlak (3). Ovisno o prisutnosti kliničkih simptoma i vrijednostima krvnog tlaka PE dijelimo na tešku i laku (3). Prema trenutku pojave kliničkih simptoma, preeklampsija se razvrstava na rani oblik, koji nastupa prije 34. tjedna gestacije, i kasni oblik, koji se javlja nakon navedenog razdoblja. Rani oblik preeklampsije najčešće se povezuje s težim kliničkim tijekom te se često udružuje s intrauterinim zastojem rasta (IUZR). Nasuprot tomu, kasna preeklampsija obično pokazuje blažu kliničku prezentaciju te se dominantno manifestira kao „majčinski fenotip“, obilježen prije svega povišenim arterijskim tlakom i prisutnošću proteinurije (4).

Tablica 1. Dijagnostički kriteriji za hipertenzivne poremećaje trudnoće (American College of Obstetricians and Gynecologists - ACOG).

Poremećaj	Kriteriji
Gestacijska hipertenzija	RR $\geq$ 140/90 mmHg nakon 20. tjedna gestacije u prethodno normotenzivnih žena
Proteinurija	300 mg/24 h, ili Protein/kreatinin omjer $\geq$ 0,3 ili 1+ u slučajnom uzorku urina
Trombocitopenija	Trombociti < 100,000 $\mu$ L
Renalna insuficijencija	Serumski kreatinin >1,1 mg/L
Poremećaj jetrene funkcije	Serumske transaminaze dvostruke veće
Simptomi središnjeg živčanog sustava	Glavobolja, vizualne smetnje, konvulzije
Plućni edem	

## 1.2. Razvoj trofoblasta

Nakon implantacije blastociste u stijenku maternice započinje diferencijacija stanica na vanjski sloj stanica, trofoblast i unutarnji sloj stanica, embrioblast. Stanice trofoblasta imaju epitelni karakter te imaju mogućnost brze proliferacije i diferencijacije u dva oblika stanica, vanjski sloj stanica koje su multinuklearnog karaktera, odnosno sinciotrofoblast i unutarnji sloj stanica koje su mononuklearnog karaktera, odnosno citotrofoblast (5). U ljudi je stanična fuzija pod normalnim uvjetima ograničena na tek nekoliko tipova stanica. U

posteljici ona predstavlja ključan proces u stvaranju sinciciotrofoblasta koji ima obilježja goleme stanice, multinuklearne trofoblastne populacije koja sadrži brojne jezgre unutar međusobno povezanog citoplazmatskog sustava i čini primarno sučelje koje odvaja majčinu krv od fetalnog tkiva. Jedinstvena građa sinciciotrofoblasta omogućuje učinkovitu razmjenu hranjivih tvari i plinova između majčinog i fetalnog tkiva, dok istodobno ograničava ulazak potencijalno štetnih tvari i majčinih imunoloških stanica zahvaljujući odsutnosti međustaničnih spojeva (6, 7).

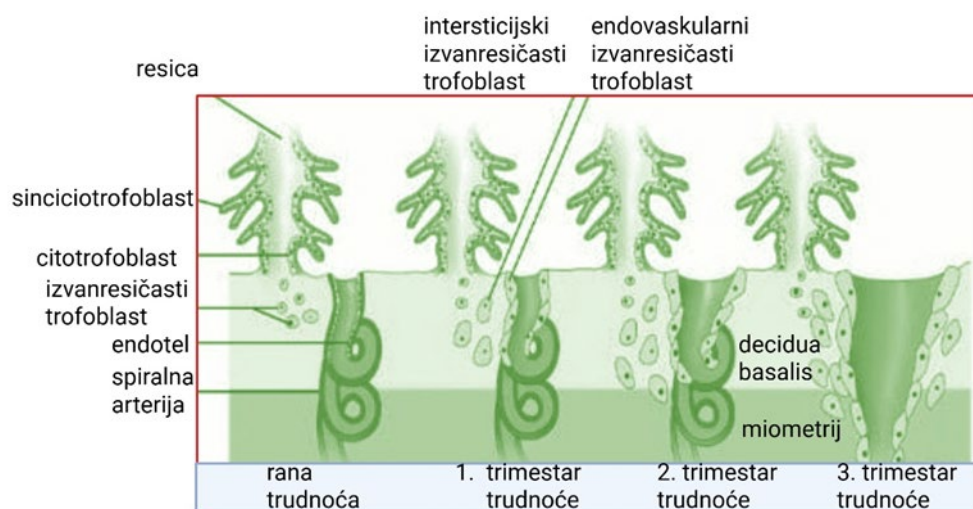
Sinciciotrofoblast proizvodi i metabolizira brojne hormone, citokine i druge biološki aktivne medijatore koji se otpuštaju u majčinu krv te imaju ključnu ulogu u regulaciji majčina metabolizma i imunološkog odgovora, omogućujući rast fetusa i uspješan ishod trudnoće (8). Stanice embrioblasta su visoko proliferativne stanice te će se tijekom embrionalnog razvoja diferencirati u različite skupine embrionalnih tkiva (5). Stanice embrioblasta raspoređuju se u dva sloja stanica koje će činiti dvoslojni zametni štiti te se unutar epiblasta formira amnionska šupljina. Nakon što se blastocista implantirala tijekom daljnjeg razvoja ona prodire dublje u endometriju maternice. Tijekom intenzivnog prodiranja blastociste stanice trofoblasta bujaju te se u sinciciju pojavljuju vakuole. Vakuole se stapaju te nastaju velike lakune i taj stadij naziva se lakunarni stadij. Tijekom ovog stadija sinciciotrofoblast prožima trofoblast. Zatim, sinciciotrofoblast prodire dublje u stromu i tijekom toga procesa nagriža endotel majčinih krvnih žila te se takve kapilare, sada proširene, nazivaju sinusoidama. Postupno se sinusoide otvaraju u prostore lakuna te se majčina krv ulijeva u njih i uspostavlja se uretroplacentalni otok krvi. Između citotrofoblasta i egzocelomske šupljine stvaraju se stanice koje će tvoriti izvanembrionalni mezoderm. Tijekom daljnjeg razvoja stvaraju se šupljine u izvanembrionalnom mezodermu i nastaje nova šupljina, korionska šupljina (9).

Budući da citotrofoblast zadržava proliferativnu sposobnost sudjelovati će u procesu nastanka plutajućih i usidrenih resica (10). Stanice citotrofoblasta utiskuju se u sinciciotrofoblast te nastaju resičaste tvorbe trofoblasta, te takve tvorbe nazivamo primitivnim resicama. Daljnjim razvojem stanice mezoderma urastaju u korionsku ploču i ispunjavaju je tvoreći sekundarne resice.

Diferenciranjem stanica mezoderma u resicama stvaraju se krvne stanice i male krvne žile. Dok se u resicama uspostavlja kapilarna mreža i takve tvorbe sada nazivamo tercijarnim resicama. Nakon formiranja tercijarnih resica slijedi spajanje kapilara u tercijarnim resicama s

kapilarama mezoderma korionske ploče i embrionalnog drška. Nakon toga one se spajaju s krvnim žilama embrija. Na ovakav način povezuju se krvožilni sustav placente i embrija (9).

Spiralne arterije majke dovode krv u posteljicu, dok citotrofoblast endovaskularnim prodiranjem razgrađuju endotel majčinih arterija te se krv oslobađa u intervilozne prostore (Slika 1.).



Slika 1. Transformacija spiralnih arterija. Stanice endovaskularnog izvanresičastog trofoblasta razgrađuju endotel, glatke mišićne stanice i elastična vlakna spiralnih arterija. Izvanresičasti trofoblast se diferencira u vrlo invazivni intersticijski izvanresičasti trofoblast i prodire u deciduu i miometrij. Slika je izrađena u Biorender softveru <https://BioRender.com>

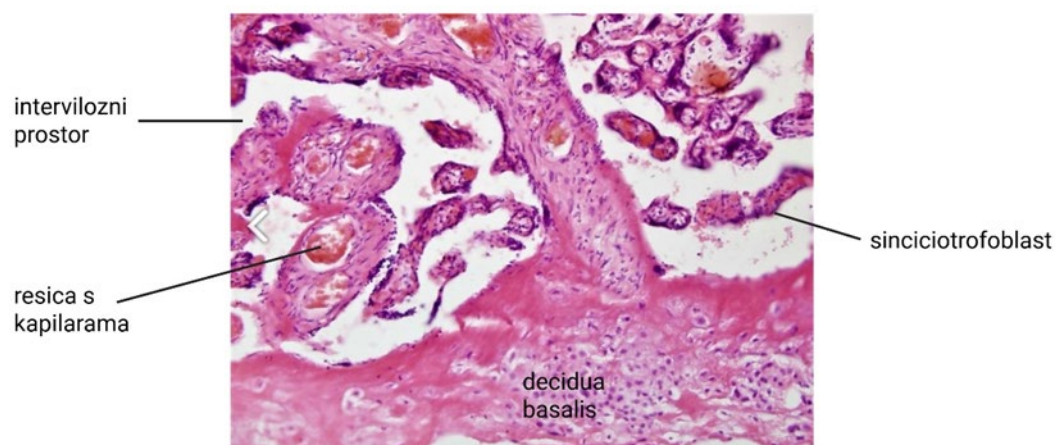
Zbog prodiranja citotrofoblasta i mijenjanja endotela krvnih žila, one postaju krvne žile velikog promjera i malog otpora, što za posljedicu ima smanjen tlak te povećan ulazak krvi majke u intervilozne prostore (9). Izvanresičasti trofoblast (ETV) sudjeluje u endovaskularnoj invaziji i intersticijskoj invaziji strome endometrija maternice (Slika 1.). Koliko će placentacija blastociste biti uspješna ovisi o djelovanju fetalnog trofoblasta kao i izmjene majčine decidue basalis, u kombinaciji s imunološkim odgovorom te aktivacijom brojnih čimbenika rasta te transkripcijskih faktora (10).

### 1.3. Nastanak resičastog koriona i decidue basalis

Tijekom ranog razvoja ploda korionske resice pokrivaju cijelu površinu koriona. Kako trudnoća napreduje, na embrionalnom polu resice se granaju i tvore resičasti korion (*lat.chorion frondosum*), dok na suprotnom polu degeneriraju te nastaje glatki korion (*lat.chorion laeve*). Decidua capsularis predstavlja dio endometrija koji prekriva glatki korion i zajedno s njime čini periferni dio fetalnih membrana. Širenjem amnionske šupljine decidua capsularis postaje sve tanja, sve dok korioamnion ne dođe u kontakt s deciduom parietalis. Decidua basalis nalazi se ispod resičastog koriona, u području buduće posteljice. Korionske matične resice urastaju u deciduu basalis i učvršćuju se za nju. Daljnjim rastom trudnoće glatki korion srasta s deciduom parietalis (9).

### 1.4. Posteljica

Posteljica (*lat. placenta*) (Slika 2.) je privremeni organ koji se formira tijekom ranog stupnja trudnoće, a čine ga tkivo majke i tkivo ploda te zajedno tvore funkcionalnu i morfološku cjelinu (11). Posteljična membrana je mjesto gdje dolazi do razmjene tvari između majke i fetusa. Ova razmjena je ključna za prijenos plinova, elektrolita, hormona, majčinih antitijela, fetalnih otpadnih tvari te hranjivih tvari poput vode, aminokiselina, glukoze, vitamina i slobodnih masnih kiselina (12).



Slika 2. Normalna posteljica s deciduom basalis, brojnim resicama i interviloznim prostorima. Bojanje hemalaun eozin. Slika snimljena pod povećanjem  $\times 20$ . Autorica: Martina Vukoja

Ljudska posteljica sastoji se od dva tipa trofoblasta: resičasti trofoblast (vilozni) i izvanresičasti trofoblast (ekstravilozni trofoblast). Resičasti trofoblast (VT) omogućava prijenos plinova i hranjivih tvari, dok izvanresičasti trofoblast (EVT) prodire u sluznicu maternice, modificira krvne žile majke, čime omogućuje prijenos majčine krvi u intervilozni prostor. Abnormalna diferencijacija trofoblasta vodi do disfunkcije posteljice i povezana je s velikim brojem neželjenih ishoda u trudnoći, kao što je preeklampsija (PE) i zaostajanje u fetalnom razvoju (13). Tijekom prvog tromjesečja trudnoće, trofoblast igra ključnu ulogu u angiogenetskim funkcijama, posebice u procesu invazije na majčine spiralne arterije u miometriju. Zbog toga, poremećaj funkcije trofoblasta može rezultirati nizom nepovoljnih događaja u trudnoći, kao što su zaostajanje u razvoju, spontani pobačaj, preuranjeni porođaj i PE. Preeklampsija je složena multisistemska bolest koja uključuje angiogenetske, metaboličke, imunološke i genetičke čimbenike. Dijagnosticira se pojavom iznenadne hipertenzije nakon 20. tjedna trudnoće s pojavom protenurije, disfunkcijom majčinih organa ili disfunkcijom posteljice (2, 14).

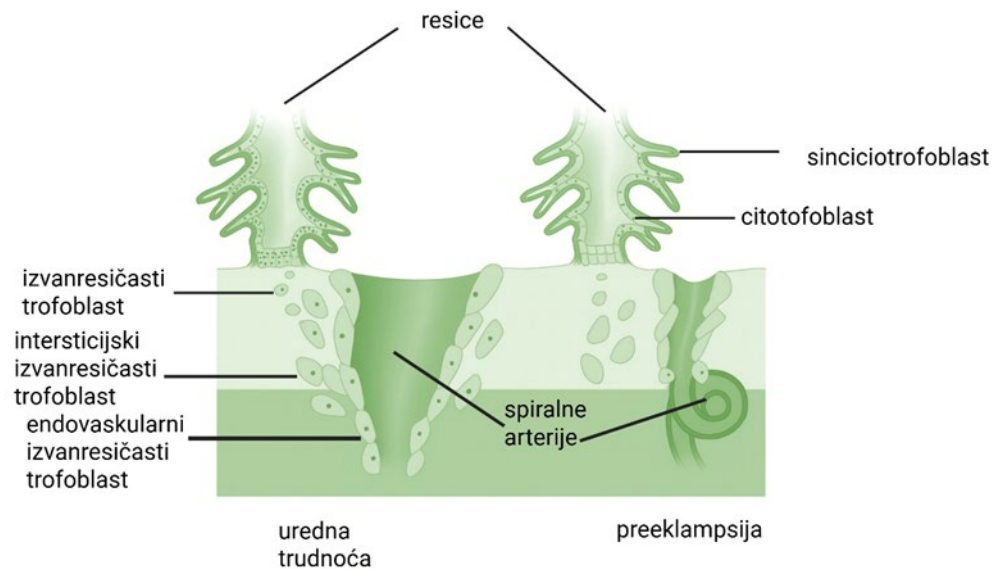
Najinvazivnije stanice posteljice su EVT, koje su u izravnoj komunikaciji s imunološkim stanicama u majčinoj decidui posteljice (13-16). Složenost interakcija između imunoloških stanica i trofoblasta na majčinsko-fetalnoj granici još uvijek nije potpuno razjašnjena.

## **1.5. Patogeneza PE**

Preeklampsija je ozbiljna i potencijalno opasna komplikacija trudnoće koja se najčešće pojavljuje nakon 20. tjedna gestacije (17). Karakterizira je kombinacija povišenog krvnog tlaka (hipertenzije) i prisutnosti proteina u mokraći (proteinurije), što upućuje na oštećenje bubrega kao jednog od ciljnih organa (18). Ovo stanje utječe na oko 5 do 8% trudnica u općoj populaciji, što ga čini jednim od najčešćih poremećaja u trudnoći s potencijalno ozbiljnim posljedicama za majku i dijete (17).

Iako točan uzrok preeklampsije još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, postoje jasni dokazi koji ukazuju na poremećaje u razvoju posteljice kao ključni čimbenik u patogenezi bolesti (19). Normalan razvoj placente podrazumijeva invaziju citotrofoblasta, stanica koje

prodiru u materničnu sluznicu i remodeliraju krvne žile kako bi povećale njihovu propusnost i tako osigurale adekvatan dotok krvi fetusu. U slučaju preeklampsije, ta invazija je nedovoljna ili nepravilna, što uzrokuje neefikasnu vaskularizaciju i smanjeni protok krvi kroz majčinu stranu posteljice (Slika 3.).



Slika 3. Shematski prikaz normalne placencije pokazuje endovaskularnu invaziju spiralnih arterija i nastanak uretoplacentalnih krvnih žila širokog lumena i niskog otpora protoku krvi. Kod preeklampsije postoji nepotpuna endovaskularna invazija trofoblata u miometralni dio spiralnih arterija što rezultira nastankom krvnih žila uskog lumena i visokog otpora protoku krvi. Slika je izrađena u Biorender softveru <https://BioRender.com>.

Neadekvatna perfuzija dovodi do hipoksije i stres oksidacije unutar placente (20). Stres oksidacija u placenti potiče oslobađanje različitih proupalnih citokina i drugih signalnih molekula u majčin krvotok, što pokreće sustavnu upalnu reakciju i oštećuje endotelne stanice (21). Ovaj endotelni disfunkcijski odgovor doprinosi povišenju krvnog tlaka i drugim simptomima preeklampsije, uključujući edeme i poremećaje u funkciji bubrega i jetre. Upalni procesi i oksidativni stres također mogu povećati rizik od tromboze i oštećenja drugih organa (21). Preeklampsija može progresivno dovesti do težih komplikacija, uključujući eklampsiju, stanje obilježeno napadajima i gubitkom svijest, koje može biti smrtonosno za majku i fetus ako se ne liječi na vrijeme. Osim toga, preeklampsija povećava rizik od prijevremenog poroda, zastoja u rastu fetusa, prerano odvajanje posteljice (*lat. abruptio placentae*) i dugoročnih kardiovaskularnih problema za majku (22). Liječenje preeklampsije prvenstveno

se usmjerava na kontrolu krvnog tlaka kako bi se smanjio rizik od komplikacija i praćenje majke i fetusa do termina poroda. U blažim slučajevima, terapija se može sastojati od redovnog praćenja i medikamentozne kontrole krvnog tlaka (23). U teškim slučajevima, posebno kada postoji značajan rizik po zdravlje majke ili djeteta, indicirano je induciranje poroda ili carskim rezom, bez obzira na gestacijsku dob, kako bi se spriječile ozbiljne posljedice. Prevencija preeklampsije također je predmet intenzivnih istraživanja. Primjena niskih doza acetilsalicilne kiseline (aspirina) pokazala se kao učinkovita metoda u smanjenju rizika od razvoja ovog stanja kod žena koje su identificirane kao visokorizične trudnice, npr. zbog prethodne preeklampsije, kronične hipertenzije ili drugih faktora rizika. Najbolji učinak postiže se ako se aspirin počne uzimati rano u trudnoći, obično prije 16. tjedna gestacije (23).

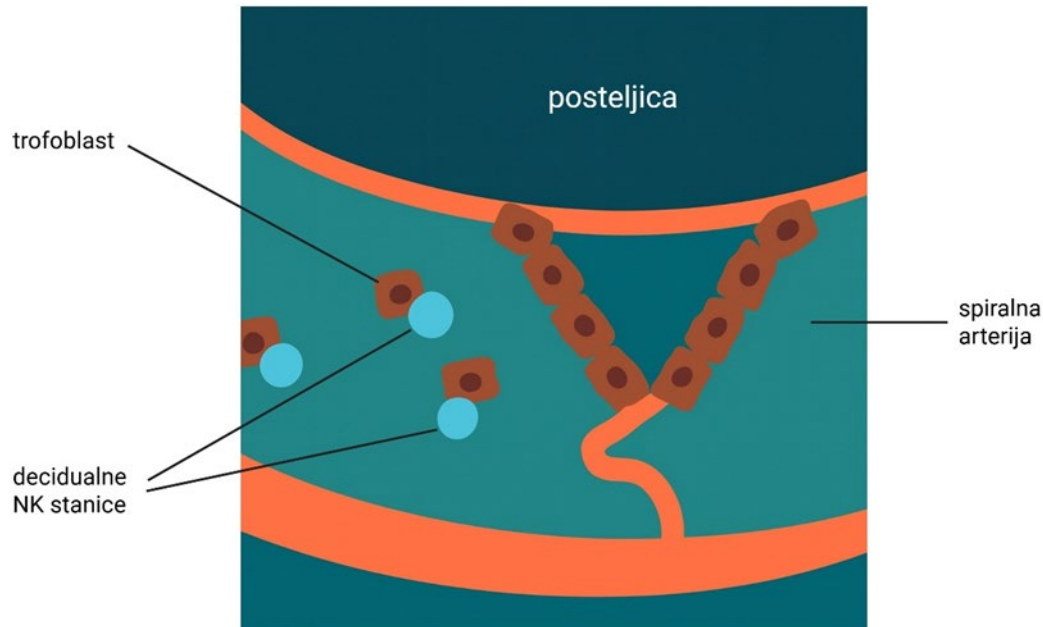
S obzirom na ozbiljne posljedice preeklampsije, rani prenatalni pregledi presudni su za rano otkrivanje trudnica s čimbenicima rizika (24). Stoga je pravovremeno uvođenje preventivnih mjera i adekvatno liječenje iznimno važno i značajno utječe na smanjenje morbiditeta i mortaliteta preeklampsije. Žene koje su imale preeklampsiju u prethodnim trudnoćama poželjno je pratiti i informirati o riziku od ponovne pojave, kao i o dugoročnim zdravstvenim posljedicama, koje uključuju veći rizik za razvoj kroničnih bolesti poput hipertenzije i bolesti srca. Zbog toga je multidisciplinarni pristup u praćenju i liječenju ovih pacijentica nužan kako u trudnoći tako i nakon poroda (25).

## 1.6. Prirodnoubilačke stanice

Prirodnoubilačke stanice (*engl.* Natural Killers, NK) pripadaju urođenom imunološkom sustavu i imaju ključnu ulogu u obrani od virusnih infekcija, malignih bolesti te imunološkom odgovoru u posteljničnom tkivu (Slika 4.).

Zahvaljujući sposobnosti prepoznavanja vlastitih i stranih stanica te uništavanja virusom zaraženih i tumorskih stanica, NK stanice značajno doprinose održavanju zdravlja čovjeka i predstavljaju vrijedan alat u imunoterapiji i borbi protiv bolesti (26). NK stanice obavljaju dvije glavne uloge, uništavanje ciljnih stanica te proizvodnju citokina i to bez potrebe za rearanžiranje gena za antigenske receptore. Umjesto toga, koriste različite aktivacijske i inhibitorne receptore koji prepoznaju očuvane molekularne obrasce, što im omogućuje brzu reakciju i djelovanje kao prva linija obrane od infekcija i staničnih transformacija. Njihova citotoksična funkcija temelji se na stvaranju imunološke sinapse, specijalizirane kontaktne

točke preko koje NK stanice usmjeravaju izlučivanje citotoksičnih granula, posebnih sekretornih lizozoma koji sadrže perforin i granzime, a koji pokreću uništavanje ciljnih stanica (27).



Slika 4. Shematski prikaz odnosa NK stanica i stanica trofoblasta u decidui basalis normalne posteljice. Slika je izrađena u Biorender softveru <https://BioRender.com>

NK stanice se ne ističu samo citotoksičnom aktivnošću, već i sposobnošću brze sekrecije različitih citokina i kemokina, uključujući interferon gama ( $\text{IFN-}\gamma$ ) i tumorski faktor nekroze alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ). Te signalne molekule imaju važnu ulogu u usmjeravanju imunološkog odgovora, poticanju upalnih procesa i regrutiranju drugih imunoloških stanica na mjesto djelovanja (26). Decidualne prirodno-bilačke stanice (dNK) stanice čine dominantnu populaciju imunoloških stanica u decidui, a sve nepravilnosti u njihovoj količini, izgledu ili djelovanju smatraju se važnim čimbenicima u nastanku preeklampsije. Decidualne NK stanice igraju ključnu ulogu u kontroli prodiranja EVT-a, u preoblikovanju spiralnih arterija maternice i u očuvanju imunološke ravnoteže tijekom trudnoće (Slika 4.) (27). U ranoj trudnoći decidualne NK stanice čine većinu limfocita u decidui. Za razliku od NK stanica koje se nalaze u perifernoj krvi, ove stanice nisu učinkovite u ubijanju ciljnih stanica, već oslobađaju signalne molekule koje podržavaju prodiranje trofoblasta, remodeliranje materničnog tkiva, rast embrija i pravilno razvijanje posteljice (28).

## 1.7 T stanice

T stanice imaju ključnu ulogu u stečenom imunološkom odgovoru i odgovorni su za prepoznavanje i reakciju na specifične antigene (29). Nastaju iz hematopoetskih matičnih stanica u koštanoj srži i sazrijevaju u timusu, gdje se diferenciraju u različite podskupine uključujući CD4<sup>+</sup> pomoćničke T stanice i CD8<sup>+</sup> citotoksične T stanice (30). Naivne T stanice cirkuliraju kroz sekundarne limfatične organe, limfne čvorove, slezenu i ostaju u mirovanju dok ne dođu u kontakt s antigen-prezentirajućim stanicama. Upravo taj signal omogućuje njihovu aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju u efektorske stanice (31). Kada se aktiviraju, efektorske T stanice imaju više funkcija. CD8<sup>+</sup> citotoksične T stanice mogu direktno uništavati zaražene ili maligne stanice, dok CD4<sup>+</sup> pomoćničke T stanice koordiniraju imunološki odgovor kroz lučenje citokina koji aktiviraju druge imunološke stanice (29). Nakon što se suzbije infekcija ili antigen nestane, većina efektorskih stanica propada, ali neki T limfociti prežive i diferenciraju se u memorijske T stanice koje ostaju dugo prisutne u organizmu i omogućuju brzu i učinkovitu reakciju pri ponovnoj izloženosti istom antigenom (31). Memorijske T stanice imaju manji prag aktivacije u odnosu na naivne stanice i mogu vrlo brzo proliferirati i postati efektorske stanice pri ponovnom kontaktu s antigenom, čime osiguravaju dugotrajnu zaštitu (31). Homeostaza populacija naivnih i memorijskih T limfocita regulirana je kombinacijom interakcija s MHC-molekulama (*engl.* Major Histocompatibility Complex) i citokinskim signalima, što omogućuje održavanje odgovarajuće količine T stanica kroz život (32). Uloga T limfocita nije samo u borbi protiv infekcija. Naime njihov disbalans ili disfunkcija može dovesti do autoimunih bolesti, kroničnih upala ili problema s tolerancijom u trudnoći, jer oni mogu biti i snažni efektori i regulatori imunog odgovora (29).

CD8<sup>+</sup> T stanice prepoznaju antigene prezentirane na molekulama MHC klase I i kao koreceptor koriste CD8 heterodimer koji omogućuje vezanje na  $\alpha 3$ -domenu MHC-I molekule (33). Kada CD8<sup>+</sup> T stanica prepozna antigen i biva aktivirana, ona se može diferencirati u efektorsku citotoksičnu stanicu (CTL) sposobnu uništiti stanice koje iskazuju antigen-MHC kompleks (34). Glavne mehanizme kojima CD8<sup>+</sup> T stanice uništavaju ciljane stanice čine otpuštanje citotoksičnih granula koje sadrže proteine kao što su perforin i granzimi, što dovodi do permeabilizacije membrane ciljne stanice i indukcije apoptoze (33).

Alternativno, CD8<sup>+</sup> T stanice mogu inducirati apoptozu kroz interakciju putem Fas ligand (FasL) s receptorom Fas na ciljnoj stanici (34). Osim citotoksičnih mehanizama, CD8<sup>+</sup> T stanice mogu izlučivati citokine, primjerice interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) i druge, koje imaju antimikrobne i antitumorske učinke (35). Nakon što antigen nestane i infekcija bude suzbijena, većina efektorskih CD8<sup>+</sup> stanica propada, ali mali dio preživljava i diferencira se u dugovječne memorijske CD8<sup>+</sup> T stanice koje ostaju u organizmu (36, 37). Memorijske CD8<sup>+</sup> T stanice imaju epigenetske i funkcionalne prilagodbe koje omogućuju da pri ponovnoj izloženosti antigenu brže i snažnije reagiraju ponovnim stvaranjem efektorskih citotoksičnih stanica (37, 38). CD8<sup>+</sup> T stanice igraju ključnu ulogu u kontroli virusnih infekcija, eliminaciji tumorskih stanica i imunološkoj nadzornoj funkciji (35). Međutim, u uvjetima kronične infekcije, tumorima ili drugim stanjima povezanim s imunosupresivnim mikrookolišem, CD8<sup>+</sup> T stanice mogu ući u stanje disfunkcije ili „iscrpljenosti”, što se ogleda smanjenom sposobnošću za citotoksičnost, slabijom produkcijom citokina i smanjenom proliferacijom (35, 39). Zbog svoje sposobnosti da prepoznaju i uništavaju stanice koje nose patogene antigene ili su maligno promijenjene, CD8<sup>+</sup> T stanice su često predmet istraživanja u sklopu imunoterapije, cijepljenja i kontrole kroničnih infekcija (35, 40).

Preeklampsija se očituje nizom poremećaja u imunološkom sustavu, uključujući pojačanu funkciju neutrofila, monocita i NK stanica, disfunkciju u lučenju citokina, prevlast Th1 stanica nad Th2 stanicama, neuravnotežene razine Th17 i T regulatornih stanica (T regs), te razvoj autoimunih odgovora. Ovi poremećaji zajedno doprinose imunološkoj disregulaciji koja je karakteristična za preeklampsiju (41). U preeklampsiji dolazi do poremećaja u lučenju citokina, što može narušiti ravnotežu među T-staničnim populacijama, gdje prevladavaju  $\gamma\delta$  T stanični receptori. Dok u normalnoj trudnoći omjer naivnih, efektorskih i memorijskih T stanica ostaje nepromijenjen, brojna istraživanja pokazuju da u PE dolazi do promjena u relativnim udjelima cirkulirajućih T-staničnih podskupina, s posebnom promjenom u frekvenciji CD4<sup>+</sup> pomoćničkih T stanica (42). Efektorske CD8<sup>+</sup> T stanice važne su za uspostavljanje ravnoteže između zaštitne imunološke reakcije na infekcije i tolerancije prema fetoplacentarnom sustavu. Uz to, pretpostavlja se da imaju značajnu ulogu u poticanju imunološke tolerancije, što je od presudne važnosti za urednu trudnoću (43). Žene s preeklampsijom imaju povećanu količinu efektorskih T-stanica, što se očituje ili većim brojem tih stanica ili izraženijim stupnjem njihove aktivacije (44).

## 1.8 Interferon gama (IFN- $\gamma$ )

Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) je vrsta citokina koja igra ključnu ulogu u regulaciji stanično posredovanog imuniteta i u koordinaciji odgovora protiv intracelularnih patogena kao što su virusi i bakterije (45). Interferon gama se u organizmu pojavljuje kao homodimerni protein, a gen koji ga kodira smješten je na ljudskom kromosomu dvanaest što je utvrđeno molekularnim mapiranjem gena (46). Glavni izvori interferona gama su aktivirani T limfociti i NK stanice te proizvodnja dodatno ovisi o citokinima i prepoznavanju antigena putem receptora T stanica (47).

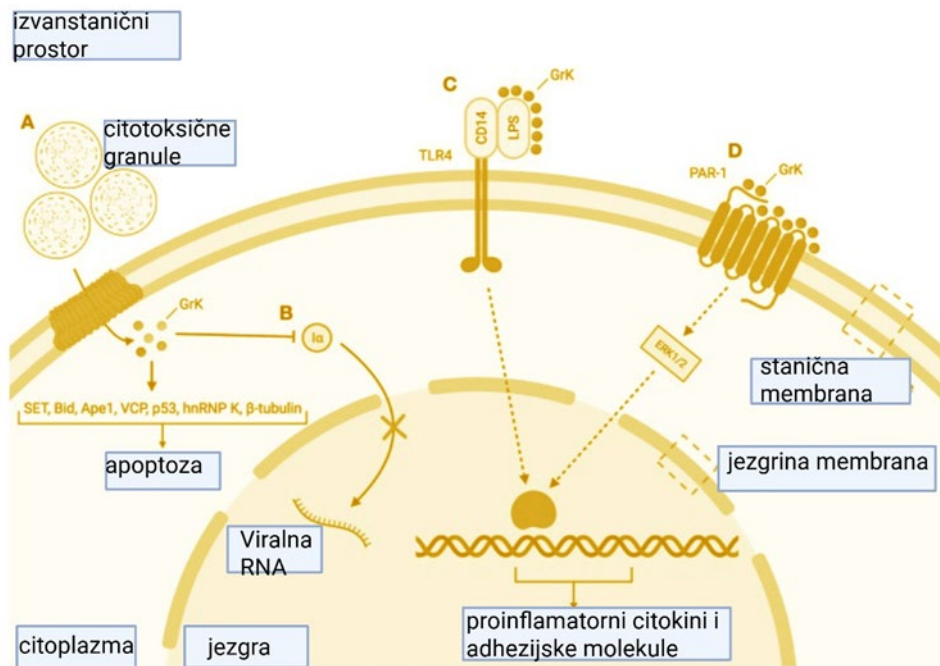
Decidualne NK stanice luče IFN- $\gamma$ , koji ima sposobnost pokretanja apoptoze u primarnim ljudskim trofoblastnim stanicama, čime sudjeluje u regulaciji funkcije trofoblasta tijekom trudnoće (48). Tijekom ranog razvoja trudnoće, pro-upalni citokin IFN- $\gamma$  izlučuje se u maternici, uglavnom zahvaljujući decidualnim NK stanicama u majčinom endometriju, dok ga kod nekih vrsta proizvodi i trofoblast. U normalnim mišjim trudnoćama IFN- $\gamma$  igra važnu ulogu u preoblikovanju krvnih žila endometrija, poticanju stvaranja novih krvnih žila na mjestima implantacije te u očuvanju funkcionalnog decidualnog sloja posteljice (49).

Interferon gama utječe na fenotip ekstraviloznog trofoblasta i na sposobnost njihovog rasta i migracije kroz deciduu (50). In vitro eksperimenti su pokazali da visoke koncentracije interferona gama inhibiraju invaziju ekstraviloznog trofoblasta djelovanjem koje uključuje povećanje apoptoze i smanjenje aktivnosti proteaza potrebnih za razgradnju ekstracelularnog matriksa (51). Interferon gama može smanjiti ekspresiju receptora koji podupiru migraciju trofoblasta kao što je receptorski sustav za inzulinu povezane faktore te time umanjuje sposobnost trofoblasta da se širi i invadira (52). Povišena razina interferona gama u eksperimentalnim modelima i u uzorcima iz placente doveli su do aktivacije JAK/STAT1 signalizacije i uključivanja negativne povratne regulacije kroz SOCS1 što rezultira smanjenom invazijom trofoblasta (48). Učinci interferona gama često se pojačavaju u kombinaciji s drugim proinflamatornim citokinima te je dokazano da zajedno s TNF alfa dovodi do većeg porasta apoptoze i smanjenja proliferacije trofoblasta (53). U tkivu posteljica s preeklampsijom uočena je povećana imunohistokemijska ekspresija interferona gama u odnosu na normale što upućuje na njegovu povezanost s patološkim stanjem posteljice (54).

Tijekom normalne trudnoće dolazi do promjene ekspresije interferona gama (IFN- $\gamma$ ) i njegova receptora IFN- $\gamma$ R2 u posteljici, povezane s prijelazom iz ranog hipoksičnog u kasniji normoksični okoliš. U preeklampsiji taj je razvojni prijelaz poremećen, što upućuje na abnormalnu imunološku prilagodbu placente (55).

## 1.9 Granzim K (GZMK)

Granzim K (GZMK) pripada obitelji serinskih proteaza koje NK stanice citotoksični T limfociti koriste za uništavanje ciljnih stanica (56). Iako je ranije smatran prije svega molekulom za induciranje smrti stanica, GZMK ima i druge važne uloge u imunološkoj regulaciji i upalnim procesima (Slika 5.) (57).



Slika 5. Shema prikazuje ključne komponente i signalne mehanizme uključene u stanični imunološki odgovor. U izvanstaničnom prostoru vidljive su citotoksične granule (A) koje sudjeluju u efektorskim funkcijama imunoloških stanica. Aktivacija membranskih receptora, uključujući TLR4, CD81 (C) i PAR-1 (D) inicira kaskadu unutarstaničnih signalnih događaja te modulira fosforilaciju više regulatornih proteina (SET, Bid, Ape1, VCP, p53, hnRNP K i  $\beta$ -tubulin). Ovi procesi kolektivno potiču aktivaciju apoptotskih putova (B) te induciraju ekspresiju proinflamatornih citokina i adhezijskih molekula. Prisutnost virusne RNA unutar citosola dodatno ukazuje na imunološku aktivaciju posredovanu prepoznavanjem virusnog patogena. Slika kreirana u biorenderu <https://BioRender.com>.

Granzim K (GZMK) pripada u skupinu ljudskih granzima (A, B, H, M, K) (58). Kada je GZMK isporučen unutar ciljnih stanica može potaknuti njihovu staničnu smrt. Prekomjerna citotoksičnost usmjerena protiv trofoblasta ili staničnih populacija koje podupiru invaziju mogla bi smanjiti dubinu invazije (59).

### **1.10 Fas ligand (FasL)**

Fas (poznat i kao APO-1 ili CD95) pripada podskupini obitelji TNF receptora (TNF-R) koji sadrže unutarstaničnu „domenu smrti“ i mogu potaknuti apoptozu. Njegov fiziološki ligand, FasL (CD95L), član je pripadajuće obitelji citokina TNF-a (60). FasL, koji je izražen na aktiviranim T-limfocitima ili NK stanicama, doprinosi njihovoj sposobnosti uništavanja ciljnih stanica, poput virusom zaraženih stanica (61). FasL je membranski član obitelji TNF-citokina koji se veže na receptor Fas (CD95) i aktivira signalni put koji dovodi do apoptoze ciljnih stanica. Kada se Fas (na ciljnoj stanici) aktivira, uključuje se „domena smrti“ i pokreće kaskadu kaspaza koja završava staničnom smrću (62). Izražaj Fas receptora je češći na stanicama majčinog podrijetla, decidualnim leukocitima, što omogućuje da FasL u posteljici inducira apoptozu aktiviranih majčinskih imunoloških stanica. To se smatra dijelom mehanizma „imunološke privilegije“ feto-placentarne barijere (63). Osim membranskog Fas i FasL, u cirkulaciji postoje topivi oblici (sFas, sFasL) koji mogu modulirati signalizaciju (64). Morfološka studija je pokazala smanjen izražaj FasL u resičastom trofoblastu u žena s preeklampsijom uz povećan izražaj Fas i povećanu stopu apoptoze trofoblasta. To upućuje na neravnotežu koja može doprinijeti povećanoj staničnoj smrti trofoblasta i patološkim posljedicama u placenti (65). Stresni uvjeti u posteljici mogu potaknuti molekularne promjene koje povećavaju apoptozu trofoblasta, a Fas/FasL put je jedan od uključenih mehanizama (66).

## **2. Ciljevi i hipoteza istraživanja**

Cilj istraživanja je bio utvrditi povezanost između promjena ekspresije glasničke RNK i proteina GZMK, FasL i IFN- $\gamma$  u decidualnim CD8<sup>+</sup> T stanicama i NK stanicama kao i citotoksičnu aktivnost decidualnih limfocita.

### **Specifični ciljevi istraživanja:**

1. Utvrditi postojanje histoloških promjena na uzorcima posteljica s PE u odgovarajućem gestacijskom tjednu u odnosu na zdrave kontrole u istom gestacijskom tjednu, primjenom osnovnog histološkog bojanja.
2. Utvrditi razlike u genskoj ekspresiji GZMK, IFN- $\gamma$  i FasL u posteljicama s PE u odnosu na posteljice zdravih kontrola, u odgovarajućem gestacijskom tjednu, primjenom Real-Time qPCR tehnike.
3. Utvrditi razlike u proteinskoj ekspresiji GZMK, IFN- $\gamma$  i FasL u posteljicama s PE u odnosu na posteljice zdravih kontrola, u odgovarajućem gestacijskom tjednu, primjenom dvostruke imunofluorescencije.
4. Utvrditi citotoksičnu aktivnost decidualnih limfocita u posteljicama s PE u odnosu na kontrolnu skupinu na protočnom citometru, primjenjujući test citotoksičnosti.



### **3. Materijali i metode**

### 3.1 Biološki materijal

Istraživanje je provedeno sukladno načelima Helsinške deklaracije te ima odobrenje Etičkog povjerenstva Sveučilišne kliničke bolnice Mostar, s brojem protokola 409/19, odobrenog 24. veljače 2019. Ljubaznošću Kliničkog Zavoda za patologiju, citologiju i sudsku medicinu Sveučilišne kliničke bolnice Mostar iz arhive su prikupljeni uzorci tkiva posteljica uklopljenih u parafin (FFPE), 15 FFPE uzoraka posteljica žena s urednom trudnoćom te 15 FFPE uzoraka posteljica žena s preeklampsijom. Dodatno, uz 30 FFPE uzoraka prikupljeni su uzorci svježeg tkiva posteljice žena s preeklampsijom i žena s urednom trudnoćom izravno nakon poroda. Svježi uzorci koristili su se za citotoksičnu aktivnost decidualnih limfocita u posteljicama s PE u odnosu na kontrolnu skupinu na protočnom citometru, primjenjujući test citotoksičnosti.

Uzorci svježeg tkiva posteljice po prijemu su se razdvojili i podvrgnuli daljnjoj enzimatskoj obradi. Odabir uzoraka posteljice žena s preeklampsijom vršio se prema smjernicama Američkog društva za opstetriciju i ginekologiju (engl. American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG) (Tablica 2.). Uključujući čimbenici bili su hipertenzija sa sistoličkim tlakom  $\geq 140$  mmHg i dijastoličkim tlakom  $\geq 90$  mmHg. U slučaju odsutnosti proteinurije, PE se definira s jednim ili više stanja kao što su oštećenje jetara, uznapredovalo zatajenje bubrega, plućni edemi, trombocitopenija te oštećenja mozga i vida. Kontrolnu skupinu činili su uzorci posteljica žena koje su imale urednu trudnoću. Svi uzorci su bili upareni shodno tjednu gestacije.

Tablica 2. Kliničke značajke bolesnika u istraživanim skupinama

	<b>Preeklampsija</b> (n = 15)	<b>Kontrole</b> (n = 15)	<b>p vrijednosti</b>
<b>Dob trudnica</b> (godine), srednja vr. $\pm$ SD	28,8 $\pm$ 3,8	30,7 $\pm$ 5,1	0,3130
<b>Gestacijska dob</b> (tjedni), srednja vr. $\pm$ SD	34,8 $\pm$ 1,7	34,5 $\pm$ 2,1	0,4910
<b>Sistolički tlak</b> (mmHg), srednja vr. $\pm$ SD	167,6 $\pm$ 14,7	117 $\pm$ 11,3	0,0003
<b>Dijastolički tlak</b> (mmHg), srednja vr. $\pm$ SD	112 $\pm$ 11,4	79,5 $\pm$ 0,7	0,0014

<b>Porodajna težina</b> (grama), srednja vr. $\pm$ SD	2015 $\pm$ 648,3	2750 $\pm$ 282,8	0,06610
<b>Porod carskim rezom</b> (%)	14 (93)	5 (33,3)	0,0041
<b>Indeks tjelesne mase</b> (BMI), srednja vr. $\pm$ SD	22,9 $\pm$ 1,9	26,9 $\pm$ 4,1	0,0519
<b>Intrauterini zastoje rasta</b> (IUGR) (%)	11 (73)	1 (6,6)	0,0191
<b>Postpartalne komplikacije</b> (%)	6 (40)	0 (0)	0,1136
<b>Dob majke</b>	28,50 $\pm$ 5,50	29,47 $\pm$ 4,26	0,730
<b>Prethodni porodi</b> (M $\pm$ IqR)	0,00 $\pm$ 1	0,00 $\pm$ 1	0,928
<b>AST</b>	63,00 $\pm$ 8,70	13,58 $\pm$ 5,99	0,026
<b>ALT</b>	42,17 $\pm$ 6,69	16,68 $\pm$ 9,79	0,034
<b>Trombociti</b>	229,92 $\pm$ 121,00	278,95 $\pm$ 68,29	0,052
<b>Leukociti</b>	10,95 $\pm$ 5,02	10,46 $\pm$ 2,25	0,921
<b>Hgb</b>	120,92 $\pm$ 14,16	115,63 $\pm$ 13,31	0,464
<b>Hct</b>	0,35 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,09	0,225
<b>Urea</b>	3,62 $\pm$ 0,74	4,28 $\pm$ 1,96	0,404
<b>Kreatinin</b>	74,83 $\pm$ 8,56	78,95 $\pm$ 13,89	0,402
<b>Mokraćna kiselina</b>	336,50 $\pm$ 63,25	262,32 $\pm$ 70,57	0,004
<b>LDH</b>	348,08 $\pm$ 167,65	267,16 $\pm$ 56,41	0,028

## 3.2 Postupci

### 3.2.1 Priprema FFPE tkiva

Tkivo se po prijemu podvrgnulo dehidraciji u otopinama etanola (sadržaja v/v 25%, 50%, 75%, 96% i 100%) i otopini ksilena, a zatim se dehidrirano tkivo uklopilo u parafinske blokove. Pomoću mikrotoma uzorci su se rezali na debljinu veličine 4  $\mu$ m i stavili na predmetna stakla. Nakon toga uslijedio je proces deparafinizacije uzoraka u otopini ksilena,

ponavljajući postupak tri puta po 5 minuta, te proces rehidracije u otopinama etanola (sadržaja v/v 100%, 96% i 70%) i ispiranje uzoraka u destiliranoj vodi.

### **3.2.2 Bojanje hematoksilin-eozinom**

Nakon procesa deparafinizacije u ksilenu i rehidracije u otopinama alkohola uzorci su se inkubirali u otopini Meyerova hematoksilina u vremenskom trajanju od 10 minuta, nakon čega je uslijedilo ispiranje u mlakoj tekućoj vodi. Tkivo se nakon bojanja hematoksilinom obojilo u otopini eozina u vremenskom trajanju od 5 minuta. Nakon toga uzorci su podvrgnuti procesu dehidriranja u otopinama rastućih alkohola i ksilena. Kako bi se uzorci mogli analizirati pod svjetlosnim mikroskopom, isti su se uklapali u Canada balzam, te prekrili pokrovnicom. Tkiva obojana ovom osnovnom histološkom tehnikom hematoksilin-eozin, analizirana su pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX51, Tokyo, Japan).

### **3.2.3 Dvostruka imunofluorescencija**

Tkiva posteljica koja sadrže decidu basalis su se rezala, a zatim su uslijedili procesi ispiranja u fosfatnom puferu (PBS) i dehidracije. Tkivo se rezalo na rezove debljine 4 $\mu$ m na rotacijskom mikrotomu i stavilo na predmetna stakla, nakon čega je uslijedi proces deparafinizacije u ksilenu, dva puta po 10 minuta, a zatim su uzorci rehidratizirani u otopinama etanola sadržaja v/v 100%, 98%, 70% te isprali u destiliranoj vodi. Tako pripremljeni uzorci podvrgnuti su procesu otkrivanja antigenih mjesta. Za proces otkrivanja antigenskih mjesta koristio se citratni pufer (pH=6) u kojem su se rezovi kuhali u mikrovalnoj pećnici 15 minuta na temperaturi 95°C. Nakon otkrivanja antigenskih mjesta, rezovi su se inkubirali s odgovarajućim kombinacijama primarnih protutijela (Tablica 3.), mišje poliklonalno protutijelo CD8 (1:1000 razrjeđenje, Dako M7103, Dako Glostrup, Denmark), mišje poliklonalno protutijelo CD56 (1:1000 razrjeđenje, Leica NC-L-CD56-1B6, Biosystems Wetzlar, Germany), kuniće poliklonalno protutijelo GzmK (1:300 razrjeđenje, Sigma Aldrich HPA063181, St. Louis, MI, USA), kuniće poliklonalno protutijelo FasL (1:300 razrjeđenje, Sigma Aldrich SAB450153, St. Louis, MI, USA), kuniće poliklonalno protutijelo IFN- $\gamma$  (1:100, Cell Signaling 8455, Cell Signaling, Boston, MA, USA), jedan sat u vlažnoj komori (Tablica 3.).

Nakon procesa inkubacije s primarnim protutijelima rezovi su se ispirali u PBS-u i inkubirali s odgovarajućom kombinacijom sekundarnih protutijela: protu-kunićji IgG (H + L) i F(ab')<sub>2</sub> Fragment Alexa Flour®594 Conjugate (8889as; Cell Signaling, Boston, MA, USA) razrijeđeno na 1:1000 s Dako Antibody diluentom (S0809, Dako, Glodtrup, Denmark) i protu-mišje IgG (H + L) and F8(ab')<sub>2</sub> Fragment Alexa Fluor®488 Conjugate (4408S; Cell Signaling, Boston, USA) razrijeđeno na 1:1000 s Dako Antibody diluentom, kroz 1 sat. Nakon primjene kombinacije sekundarnih protutijela uzorci su bili isprani u otopini PBS-a, te se primijenilo bojilo za stanične jezgre, DAPI, koje se držalo 1 minutu. Nakon bojanja staničnih jezgri, rezovi su se isprali u PBS-u i uklopili u Imuno-mount (9990402, Immuno mount, Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA).

Tablica 3. Primarna i sekundarna protutijela korištena za dvostruko imunofluorescencijsko bojenje.

	<b>Protutijelo</b>	<b>Razrijeđenje</b>	<b>Domaćin</b>	<b>Stanična lokalizacija</b>	<b>Proizvođač</b>
<b>Primarna protutijela</b>	CD8	1:100	Miš	Membrana	Dako M7103
	CD56	1:100	Miš	Membrana	Leica NCL-L-CD56-1B6
	GZMK	1:300	Kunić	Citoplazma	Sigma Aldrich
	FasL	1:300	Kunić	Citoplazma	Sigma Aldrich
	IFN- $\gamma$	1 :100	Kunić	Citoplazma	Cell signalling
<b>Sekundarna protutijela</b>	protu-kunićji IgG (H + L) i F(ab') <sub>2</sub> Fragment Alexa Flour®594 Conjugate	1:1000	Koza	Citoplazma	Cell signaling 8889as
	protu-mišje IgG (H + L) and F8(ab') <sub>2</sub> Fragment Alexa Fluor®488 Conjugate	1:1000	Koza	Membrana	Cell signaling 4408S

### 3.2 Obrada mikrofotografija

Svi uzorci pregledani su upotrebom mikroskopa Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) pod objektivom povećanja  $\times 40$ . Nakon pregleda, rezovi su se fotografirali upotrebom kamere modela DP71 (Olympus, Tokyo, Japan). Snimalo se deset vidnih polja za svaki uzorak pod objektivom povećanja  $\times 40$ . Intenzitet bojanja i postotak stanica pozitivnih na GZMK, FasL i IFN- $\gamma$ , promatrao se u tkivu posteljice i to u dijelu viloznog trofoblasta i ekstraviloznog trofoblasta te u C8+ T stanicama i NK stanicama. Bojanje stanica stupnjevalo se kategorijama: -bez ekspresije; + blaga ekspresija; ++ umjerena ekspresija; +++ jaka ekspresija; n nepostojanje bojanja ( $<10\%$  stanica); f žarišno bojenje (10-50% stanica) i d difuzno bojanje ( $>50\%$  stanica). Negativne kontrole podvrgnule su se istim procedurama, osim koraka s inkubacijom primarnih protutijela. Uzorak limfnog čvora koristio se kao pozitivna kontrola. Svi uzorci su se pregledali od strane tri istraživača, neovisna jedan o drugom.

### 3.3 RNK izolacija i Real Time qPCR

Za izolaciju RNK molekula iz parafinskih uzoraka koristio se izolacijski kit Sigma Aldrich Gen Eluete™ FFPE RNA Purification kit koji je uključivao korak deparafinizacije sa ksilenom i etanolom, zatim korak s proteinazom K za uništavanje proteina u uzorku. Nakon razgradnje tkiva upotrijebile su se silikonske membrane na kojima se vršilo ispiranje RNK molekule od zaostalih staničnih dijelova s ispirajućim puferima. Za pročišćavanje RNK molekule koristio se i dodatni korak uništavanja DNK molekula, prilikom toga procesa upotrijebio se enzim DNase I za uništavanje DNK. Nakon uništavanja DNK molekula, RNK se otopio u RNA free reagensu. Nakon izolacije RNK pristupilo se mjerenju koncentracija RNK uzoraka pomoću Qubit 4 Fluorometra s HS RNA kitom. Za kvantitativnu analizu genske ekspresije upotrijebio se one-step SYBER®Green Taq Ready Mix kit, koji sadržava Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) i MgCl<sub>2</sub>. Svi uzorci su se analizirali u duplikatu na Applied Biosystems Fast 7500 RT-qPCR. Geni koji su se istraživali kvantitativno su GZMK, s redosljedom nukleotida 5'TTAAGACCTTCTGACACC3' i 3'TGGAAGACACCTTACAG5', IFN- $\gamma$  s redosljedom nukleotida 5'AGCTCTGCATCGTTTTGGTT3' i 3'GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA5'

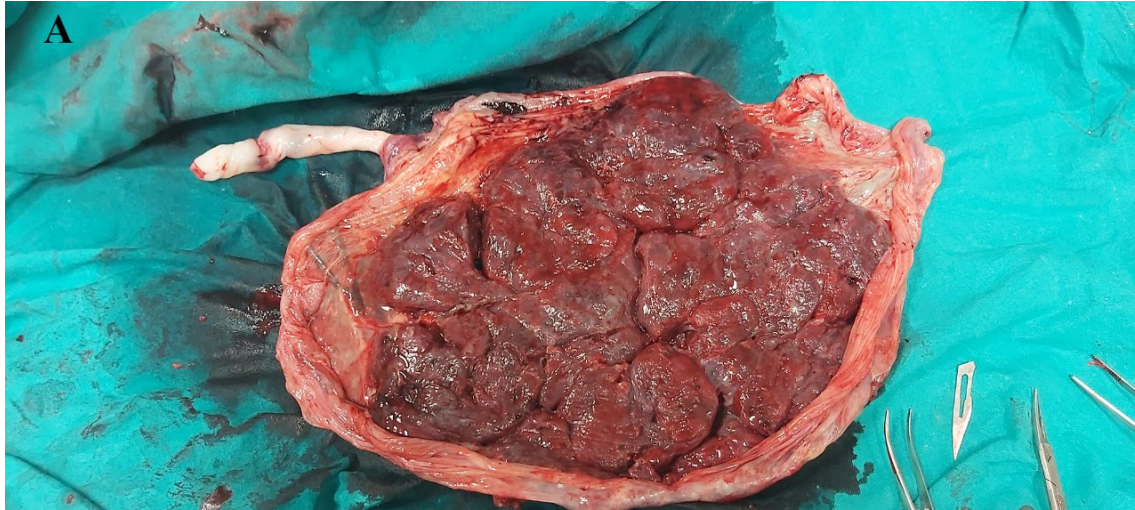
te FasL s redosljedom nukleotida 5' TGGCCTTGTGATCAATGAAA3' i 3' TCATCATCTTCCCCTCCATC5' (Tablica 4.). Glicerinaldehid-3-fostat dehidrogenaza (GADPH) se upotrijebila kao referentni gen tijekom analize. Negativna kontrola sadržavala je sve komponente osim uzorka. Rezultati su analizirani kao odnos relativne ekspresije gena u odnosu na relativnu ekspresiju zdravih kontrola.

Tablica 4. Početnice korištene za qRT-PCR.

Gen	Prednja početnica	Stražnja početnica	Veličina amplikona	T <sub>m</sub> F/R	T <sub>A</sub>	CG% F/R
GZMK	TTAAGA CCTTCT GACACC	TGGAA GACA CCTTT ACAG	191	51.1/51.2	51.1	44.44/44.44
IFN- $\gamma$	AGCTCT GCATCG TTTTGG GTT	GTTCC ATTAT CCGCT ACAT CTGAA	118	61.5/59.0	59.0	47.62/41.67
FasL	TGGCCT TGTGAT CAAT GAAA	TCATC ATCTT CCCCT CCATC	155	54.5/65.3	54.5	40.0/50.0
GAPDH	ACCCAC TCCTCC ACCTTT GAC	TCCAC CACCC TGTTG CTGTA G	110	64.5/63.9	63.9	57.14/57.14

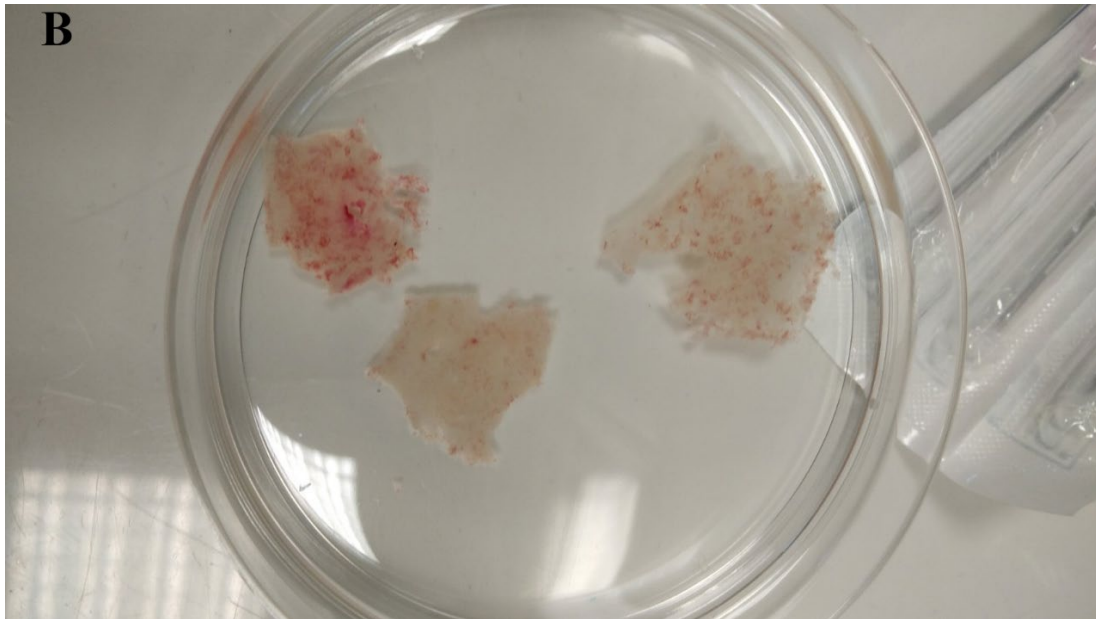
### 3.4 Priprema svježeg uzorka posteljice za test citotoksičnosti

Izolacija svježih decidualnih limfocita se provodila iz zaprimljenog posteljičnog tkiva na način da se seciralo 2 do 3 fragmenta decidue basalis s jednog kotiledona posteljice veličine 1cm x 1cm (Slika 6).



Slika 6. Majčina strana posteljice-kotiledoni. Slika potječe od materijala zaprimljenog tijekom analize tkiva. Slika izvorno snimljena fotoaparatom nakon zaprimanja posteljice s Klinike za ginekologiju i porodništvo Sveučilišne kliničke bolnice Mostar, uzeta odmah nakon porođaja. Autorica: Martina Vukoja

Odvojeni dio decidue basalis prenio se u sterilnu Petrijevu posudicu, u kojoj se nalazio sterilni 1x PBS (koji je prethodno oslobođen kalcijevih i magnezijevih iona). Odvojili su se dijelovi korionskih resica i krvnih žila te isprali u sterilnom 1x PBS-u (Slika 7) .



Slika 7. Tanka decidua basalis bez korionskih resica i krvnih žila. Slika potječe od materijala zaprimljenog tijekom analize tkiva. Slika izvorno snimljena fotoaparatom u Morfološkom laboratoriju Medicinskog fakulteta Mostar. Autorica: Martina Vukoja

Tkivo s PBS-om prenošeno je u epruvetu od 50 mL te centrifugirano pri vrijednosti RCF 300 x g 5 minuta, na sobnoj temperaturi. Supernatant se aspirirao bez ometanja peleta, te ponovno isprao u sterilnom PBS-u i centrifugirao. Tkivo se prebacilo u svježju Petrijevu posudicu te se usitnilo i homogeniziralo sa sterilnim škarama i skalpelom, ne duže od 5 minuta. Usitnjeno tkivo prebacilo se u epruvetu od 15 mL i dodalo se dvostruko veći volumen enzim akutaze, prethodno zagrijane na 37°C. Uzorci s enzimom stavili su se na automatsku miješalicu (37°C, 250 RPM) u vremenu od jedan sat. Nakon miješanja, uzorci su se dva puta centrifugirali i jednom isprali sa sterilnim 1x PBS-om. Usitnjenom i ispranom tkivu dodalo se do 20 mL sterilnog 1x PBS-a, te se procijedilo kroz staničnu cjediljku veličine pora od 100 µm. Tijekom cijedenja dodalo se još jedan put sterilni 1x PBS. Dobivena otopina se centrifugirala na 300 g 5 minuta, s podešenim ACC na 4 i BR na 2. Aspiriranjem se uklonio supernatant iznad peleta, te dodalo 15 mL ledeno hladnog PBS-a s dodatkom 2% FBS-a. U epruvetu od 50 mL dodalo se 15 mL 20% medija s gradijentom gustoće - Ficol (1,077+ 0,001 g/mL) te pomoću Pasteurove pipete, u lagano nakošenom položaju, dodala se stanična suspenzija na Ficol. Sve se centrifugiralo na 800 g u trajanju 20 minuta, na temperaturi 4°C, s podešenim ACC na 1 i BR na 1. Leukociti koji su se našli na sučelju između medija s gradijentom gustoće i PBS-a, prikupili su se u novu epruvetu od 15 mL, te se dodalo 3 puta

veći volumen sterilnog PBS-a. Centrifugiralo se na 3600 g tijekom 5 minuta, na sobnoj temperaturi, s podešenim ACC na 4 i BR 2. Dobivena suspenzija se ispirala u sterilnom PBS-u te ponovno centrifugirala prema prethodnoj uputi. Na kraju se dodalo 300 µL sterilnog PBS-a, što predstavlja radni uzorak za test citotoksičnosti na protočnom citometru.

Dio dobivenih decidualnih limfocita su obojeni na površinske biljege koristeći protutijela CCR7-FITC, CD28-PE, CD45RA-PE-Cy<sup>TM</sup>7, CD27-PerCP-Cy<sup>TM</sup>5.5, CD8-APC i CD3-APC-H7 BD Biosciences.

Obilježeni decidualni limfociti su analizirani na protočnom citometru CANTO II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, SAD), gdje je zabilježeno najmanje 100 000 događaja u gejtju za limfocite. Specifičnost bojenja potvrđena je koristeći FMO (fluorescence minus one) kao kontrolu. Analiza podataka izvedena je pomoću BD FACSDiva<sup>TM</sup> softvera (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, SAD).

Subpopulacije unutar ukupne CD8+ T stanica određene su na temelju diferencijalne ekspresije površinskih markera CD45RA, CCR7, CD27 i CD28, koji reflektiraju razvojni i funkcionalni status T stanica (Slika 8.) .

Naivne T stanice (N; CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>): Naive T stanice predstavljaju imunološki neiskusne limfocite koji još nisu došli u kontakt s antigenom. Karakterizira ih visok proliferacijski potencijal i sposobnost diferencijacije u efektorske podtipove nakon aktivacije.

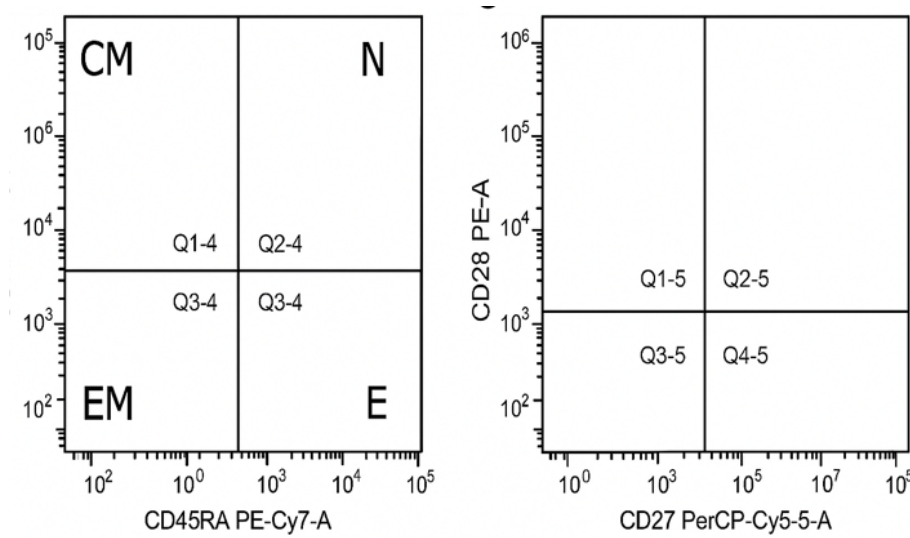
Central memory (CM; CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup>): CM stanice imaju sposobnost dugotrajnog opstanka i brzog odgovora nakon ponovne izloženosti antigenu. Povezane su s cirkulacijom kroz limfne čvorove i održavanjem imunološke memorije.

Effector memory (EM; CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup>): EM stanice cirkuliraju perifernom krvi i tkivima. Odlikuje ih brza efektorska funkcija, uključujući lučenje citokina te sposobnost direktne citotoksičnosti.

Effector T stanice (E; CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup>): Ove terminalno diferencirane stanice posjeduju snažnu citotoksičku aktivnost, ali slabiju sposobnost proliferacije. Često se pojavljuju tijekom akutnog upalnog odgovora.

Nakon uspostavljanja subpopulacija na osnovu CD45RA/CCR7, dodatna analiza CD27 i CD28 markera omogućila je procjenu stupnja diferencijacije i aktivacije unutar CD8+

populacije, budući da gubitak ovih markera prati prelazak stanice prema terminalno diferenciranom fenotipu (Slika 8.).



Slika 8. Prikazana su dva dvodimenzionalna dijagrama protočne citometrije (dot-plot sheme) korištena za definiranje fenotipskih podskupina CD8<sup>+</sup> T stanica na osnovu ekspresije površinskih markera CD45RA, CCR7, CD27 i CD28. Lijevi grafikon prikazuje kategorizaciju CD8<sup>+</sup> T stanica prema CD45RA i CCR7 biljezima. Kvadranti odgovaraju standardno diferenciranim podskupinama T stanica: N (naive) – CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> (gornji desni kvadrant), CM (central memory) – CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> (gornji lijevi kvadrant), EM (effector memory) – CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> (donji lijevi kvadrant), E (effector) – CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> (donji desni kvadrant). Desni grafikon prikazuje istu populaciju stanica analiziranu prema ekspresiji CD27 i CD28 površinskih markera, omogućujući dodatnu funkcionalnu i diferencijacijsku kategorizaciju. Dijagram preuzet iz sustava za analizu podataka protočnog citometra BD FACSDiva softver.

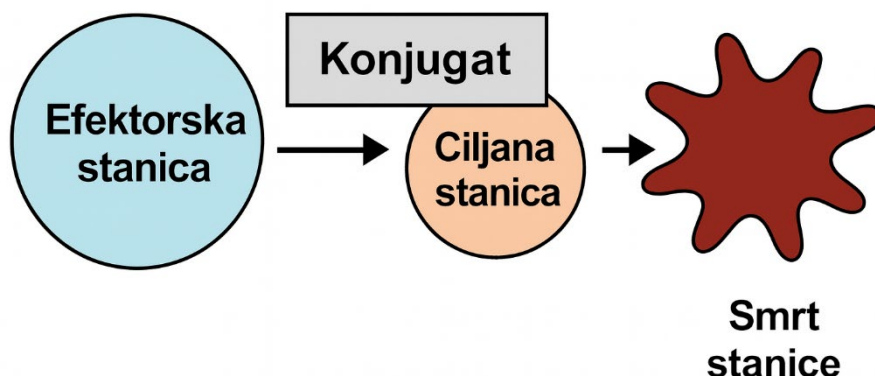
### 3.5 Test citotoksičnosti

Test citotoksičnosti predstavlja laboratorijsku metodu kojom se procjenjuje sposobnost određenih imunoloških stanica da prepoznaju, napadnu i unište druge stanice. Najčešće se ispituje funkcija NK-stanica ili citotoksičnih T stanica, jer one imaju ključnu ulogu u obrani organizma od virusno zaraženih, tumorski promijenjenih ili na drugi način oštećenih stanica. Suština testa je praćenje interakcije između dvije populacije stanica: efektorskih stanica –

stanice imunološkog sustava koje izvršavaju citotoksičko djelovanje, npr. NK-stanice ili CD8<sup>+</sup> T stanica (našem istraživanju su to izolirani decidualni limfociti iz svježeg tkiva decidue basalis) i ciljnih stanica – stanice koje efektori trebaju napasti, najčešće leukemijske stanice. Prvi korak citotoksičkog procesa jest stvaranje konjugata, tj. stabilne fizičke veze između efektorske i ciljne stanice.

Kada efektor prepozna ciljnu stanicu kao abnormalnu (npr. zbog smanjene ekspresije MHC-I molekula ili prisutnosti aktivacijskih liganda), on se za nju veže pomoću receptora na svojoj površini. Ova veza omogućuje usmjeravanje efektorskih granula prema ciljnoj stanici i otpuštanje citotoksičkih molekula (perforina, granzima) i pokretanje smrti ciljne stanice (apoptoza ili liza). Bez formiranja konjugata, citotoksični mehanizam ne može biti u potpunosti aktiviran, pa je procjena njihove učestalosti važan parametar funkcionalnosti efektorskih stanica (Slika 9.).

## Citotoksično Testiranje



Slika 9. Dijagram jasno prikazuje tijek: efektorska stanica (decidualni limfociti) → konjugat → ciljna stanica (leukemijske stanice) → smrt ciljne stanice. Dijagram kreiran u programu biorenderu <https://BioRender.com>

Za test citotoksičnosti koristili su se ciljne stanice K562 stanične linije. Stanice potječu od pacijenata koji su imali eritroleukemiju, a koje su osobito osjetljive na liziranje NK

stanicama. Stanice su se uzgajale u potpunom RPMI1640 mediju s dodatkom 20% fetalnog goveđeg seruma (*engl.* FCS) na temperaturi od 37°C u atmosferi s 5% ugljikovog (IV) oksida (CO<sub>2</sub>). Dva dana nakon pohranjivanja, odnosno u fazi eksponencijalnog rasta stanica, stanice su se prikupile/obradile, isprale u sterilnom PBS-u, a zatim su se stanice izbrojale na hemocitometru te se koncentracija podesila na  $1 \times 10^5$  / mL u RPMI 1640 mediju.

Decidualni limfociti (efektorne stanice R2) koju su dobiveni prethodnim protokolom izdvajanja limfocita iz decidue basalis svježe posteljice i ciljne stanice K562 stanične linije (ciljne stanice R1) su se pomiješale u polistirenskoj epruveti (dimenzija 12 x 75 mm<sup>2</sup>) s okruglim dnom u omjerima razrjeđenja 12.5:1 i 50:1 za decidualne limfocite. Kontrolne epruvete sadržavale su 100 µL ciljnih ili efektivnih stanica u koje se dodalo 100 µL kompletnog medija. Kontrolni uzorci koristili su se kako bi se isključile nevijabilne stanice, koje spontano nastaju tijekom cijelo noćne inkubacije. Nakon inkubacije stanice su se lagano izmiješale, kako bi se omogućilo miješanje ciljnih i efektivnih stanica, nakon čega je uslijedilo centrifugiranje podešeno na 200 g tijekom 5 minuta. Nakon centrifugiranja uslijedila je cijelo noćna inkubacija na 37°C pri atmosferi od 5% CO<sub>2</sub>. Prije kraja inkubacije, u svaku epruvetu s uzorkom dodalo se 10 µL protutijela anti-CD45 PE i 10 µL vijabilne boje 7-AAD. Epruvete su se lagano izmiješale i inkubirale na ledu tijekom 20 minuta. Za mjerenje citotoksične aktivnosti decidualnih limfocita koristio se protočni citometar FACS CANTO II i BD FACSDiva softver™ (verzija 6.0 BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Vrijednosti staničnih parametara, koji se odnosio na citotoksičnu aktivnost, korigirao se na način da se iz regije R1 (slobodne, nekonjugirane ciljne stanice) u ispitivanim uzorcima, oduzela vrijednost mrtvih stanica iz iste regije R1 i to iz uzoraka koji su sadržavali samo ciljne stanice (spontana stanična smrt), kao i broj živih i mrtvih stanica u regiji R1 koji sadržava samo efektor stanice. Nakon što smo isključili ciljne stanice koje su spontano umrle razina citotoksičnosti ispitivanih uzoraka izračunala se prema jednadžbi: citotoksičnost (%) = broj mrtvih u R1 x 100/ broj mrtvih + živih u R1. Ograda R3 predstavlja konjugate efektor stanica i ciljnih stanica.

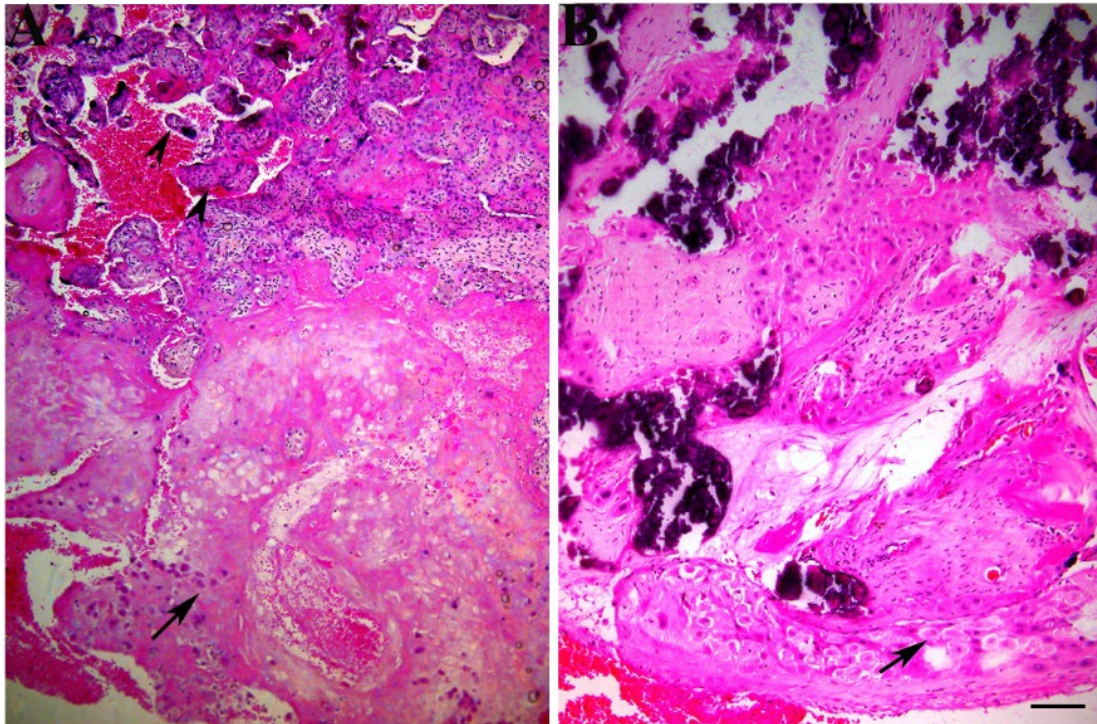
### 3.6 Statistički postupci

Statistička analiza se provodila koristeći MedCalc softver (MedCalc Statistical Software version 12.5.0.0, Mariakerke, Belgium), dok su se klinički podaci obrađivali korištenjem deskriptivne i inferencijalne statistike. Kategoričke varijable prikazane su kao

učestalost i postotak. Kolmogorov-Smirnov test je korišten za testiranje normalnosti distribucije podataka. Ovisno o distribuciji kontinuirane varijable su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon (IqR) ili kao aritmetička sredina i standardna devijacija korištenjem Man-Whitne U-Testa ili T-test za neovisne uzorke. P vrijednost  $\leq 0,05$  smatrala se statistički značajnom.

## **4. Rezultati**

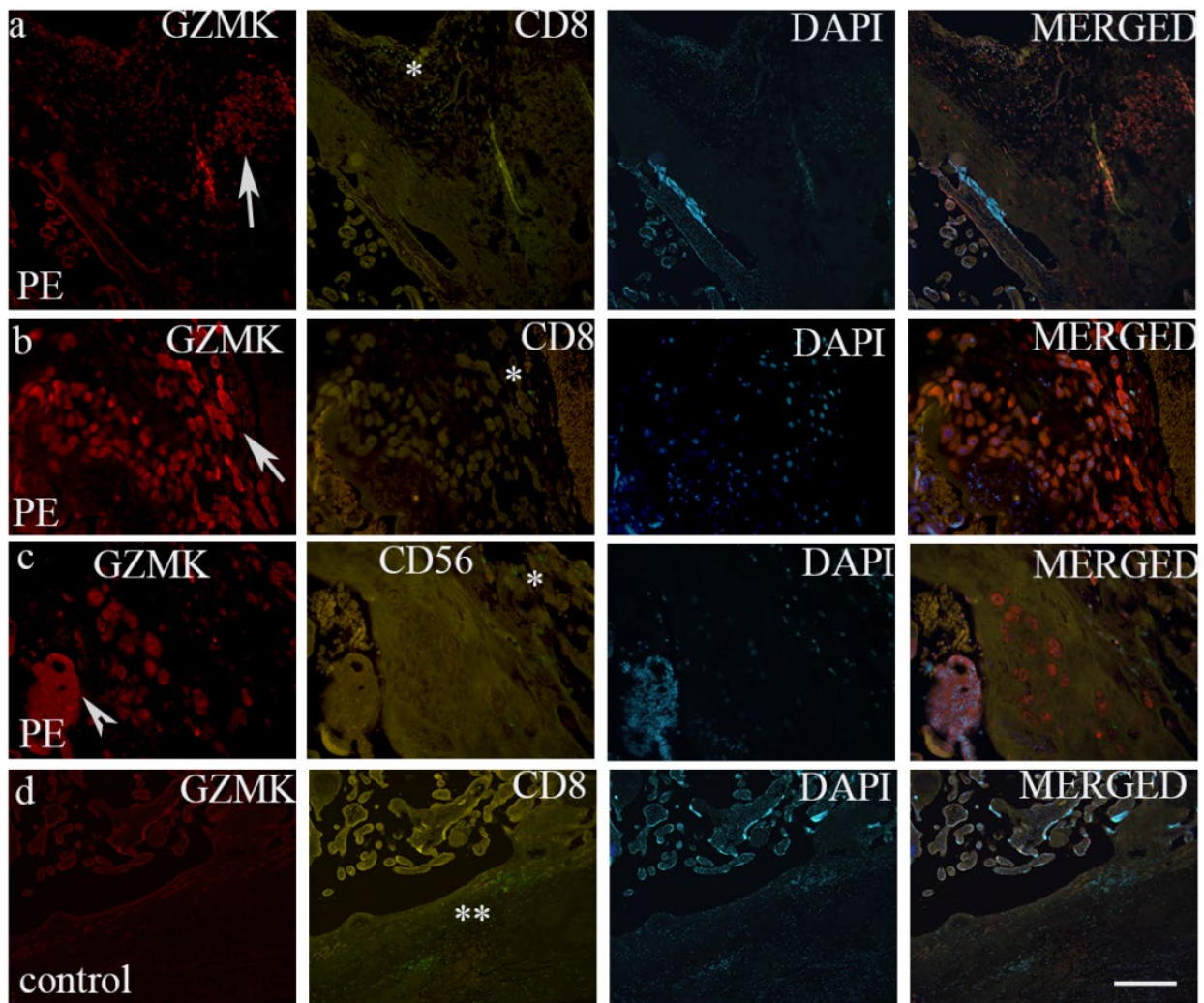
Histološke promjene u posteljicama trudnica s preeklampsijom uključivale su infarkte, povećan broj sincicijskih čvorova, intravilozna i perivilozna taloženja fibrina te hijalinizacijske promjene (Slika 10.). Uočena je razlika u intenzitetu bojenja i postotku GZMK- i FasL-pozitivnih stanica između kontrolne skupine i skupine s PE.



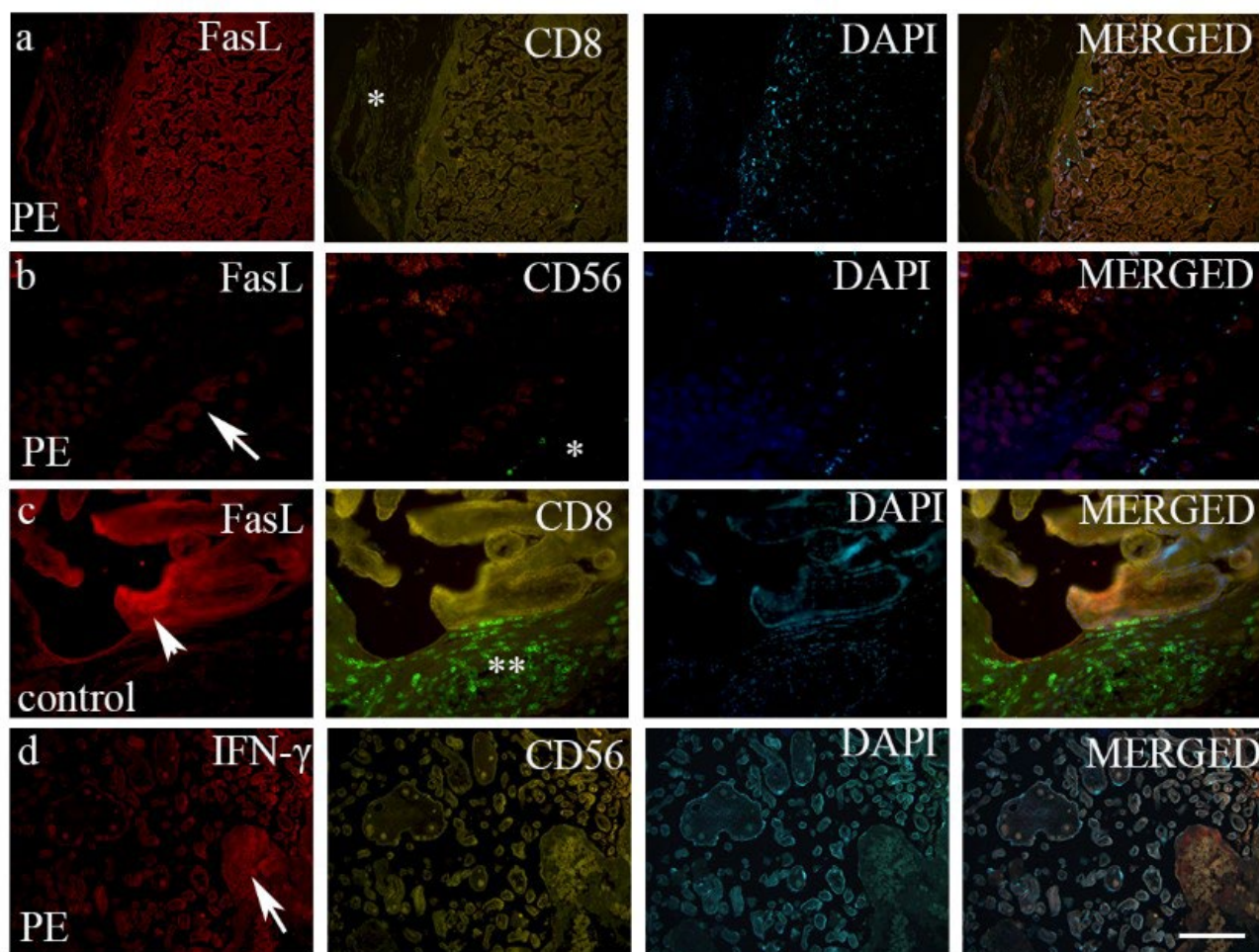
Slika 10. Posteljica žena s PE pokazuje povećane perivilozne i intravilozne naslage fibrina, hijalinizacija, zadebljane stijenke fetalnih kapilara, povećani sincicijski čvorovi (slika lijevo) i kalcifikacija (slika desno). Izvanresičasti trofoblast (strelice), resičasti trofoblast (vrhovi strelica). HE bojanje. Mjerilo 25  $\mu$ m. Slika izvorno snimljena fotoaparatom na materijalima zaprimljenim za analizu. Slika je slikana pod povećanjem od x40.

U posteljici trudnica s preeklampsijom u izvanresičastom trofoblastu zabilježena je jaka ekspresija GZMK-a (Slika 11b.) te blaga ekspresija FasL-a (Slika 12b). Nasuprot tome, u kontrolnim posteljicama izvanresičasti trofoblast pokazivao je blagu ekspresiju GZMK-a (Slika 11d.) i umjerenu ekspresiju FasL-a u resičastom trofoblastu (Slika 12c.). Intenzitet bojenja i postotak GZMK+CD8+ T stanica, FasL+CD8+ T stanica, IFN- $\gamma$ +CD8+ T stanica,

GZMK+NK stanica, FasL +NK stanica, IFN- $\gamma$  +NK stanica u kontrolnoj i PE posteljici prikazana je u Tablici 5.



Slika 11. Dvostruko imunofluorescentno bojenje za GZMK i CD8 (a, b), GZMK i CD56 (c) u PE te GZMK i CD8 (d) u posteljici zdravih kontrola. GZMK pozitivne stanice i izvanresičastom trofoblastu (strelice) i u resičastom trofoblastu (glava strelice). Pojedinačne CD8<sup>+</sup> T stanice i NK stanice mogu se vidjeti u decidui basalis posteljica s PE (\*), dok su brojne CD8<sup>+</sup> T stanice prisutne u decidui basalis posteljice zdravih kontrola (\*\*). Skalna crta 100  $\mu$ m (a i d), 25  $\mu$ m (b i c). Slike su snimljene pri povećanju  $\times 20$ ,  $\times 40$ . Slika preuzeta iz rada Vukoja, M.; Ćurlin, M.; Vukojević, K.; Jelić-Knezović, N.; Kolobarić, A.; Orlović Vlaho, M.; Šoljić, V. Effect of Granzyme K, FasL and Interferon- $\gamma$  Expression in Placentas with Preeclampsia. *Biomedicines* 2024, 12, 842. Licenca CC BY 4.0



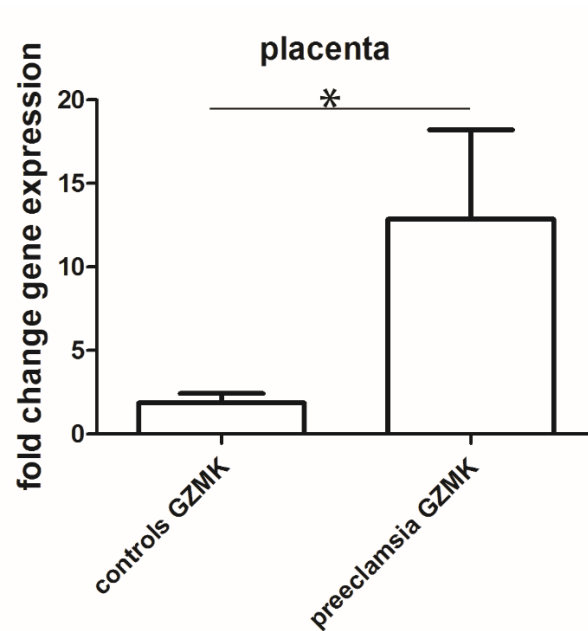
Slika 12. Dvostruko imunofluorescentno bojenje za FasL i CD8 (a), FasL i CD56 (b) u PE, FasL i CD8 u posteljici zdrave kontrole (c) te IFN- $\gamma$  i CD56 (d) u PE. FasL i IFN- $\gamma$  pozitivne stanice u izvanresičastom trofoblastu (strelice), te FasL u resičastom trofoblastu (glava strelice). Pojedinačne CD8<sup>+</sup> T stanice i CD56 pozitivne stanice (NK stanice) mogu se vidjeti u decidui basalis u PE (\*), dok se brojne CD8<sup>+</sup> T stanice mogu vidjeti u decidui basalis posteljice zdrave kontrole (\*\*). Skalna crta 100  $\mu$ m (a i d), 25  $\mu$ m (b i c). Slike su snimljene pri povećanju  $\times 20$ ,  $\times 40$ . Vukoja, M.; Ćurlin, M.; Vukojević, K.; Jelić-Knezović, N.; Kolobarić, A.; Orlović Vlaho, M.; Šoljić, V. Effect of Granzyme K, FasL and Interferon- $\gamma$  Expression in Placentas with Preeclampsia. *Biomedicines* 2024, 12, 842. Licenca CC BY 4.0.

Tablica 5. Intenzitet i proširenost bojenja za GZMK, FasL i IFN- $\gamma$  u posteljici zdravih kontrola i u preeklampsiji.

Uzorak	Vrsta stanica	GZMK	FasL	IFN- $\gamma$
<b>kontrole</b>	CD8+T stanice	+++/f	-/n	-/n
	NK+ stanice	+++/f	-/n	-/n
	Resičasti trofoblast	+/d	+++/d	+/f
	Izvanresičasti trofoblast	+/d	++/d	+/f
<b>preeklampsija</b>	CD8+T stanice	+++/f	-/n	-/n
	NK+ cells	+++/f	-/n	-/n
	Resičasti trofoblast	++/d	++/d	+/f
	Izvanresičasti Trofoblast	+++/d	+/d	+/f

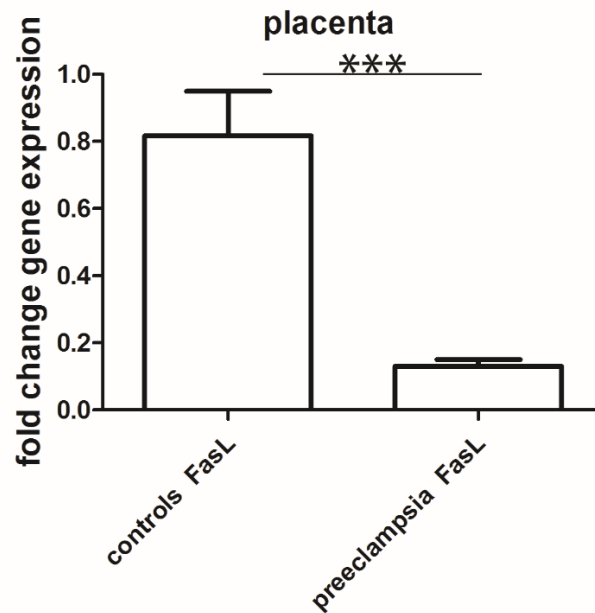
– bez ekspresije; + blaga ekspresija; ++ umjerena ekspresija; +++ jaka ekspresija; n bez bojenja (<10% stanica); f fokalno bojenje (10–50% stanica); d difuzno bojenje (>50% stanica).

Analiza RT-qPCR-a provedena na FFPE uzorcima posteljičnog tkiva potvrdila je rezultate dobivene imunofluorescencijom. Ekspresija mRNK za GZMK bila je statistički značajno viša u skupini s preeklampsijom u usporedbi sa zdravim kontrolama (Slika 13.) .

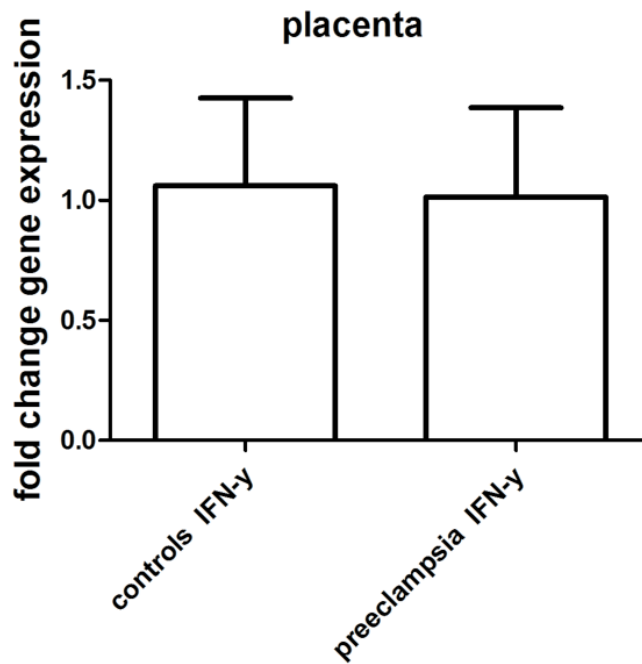


Slika 13. RT-qPCR promjena ekspresije mRNK GZMK iz FFPE posteljice teške PE u usporedbi sa zdravim kontrolama. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. Mann-Whitney test \* $p < 0,01$ . Licenca CC BY 4.0.

Suprotno tome, ekspresija mRNK za FasL bila je niža u PE skupini u odnosu na kontrole (Slika 14.).

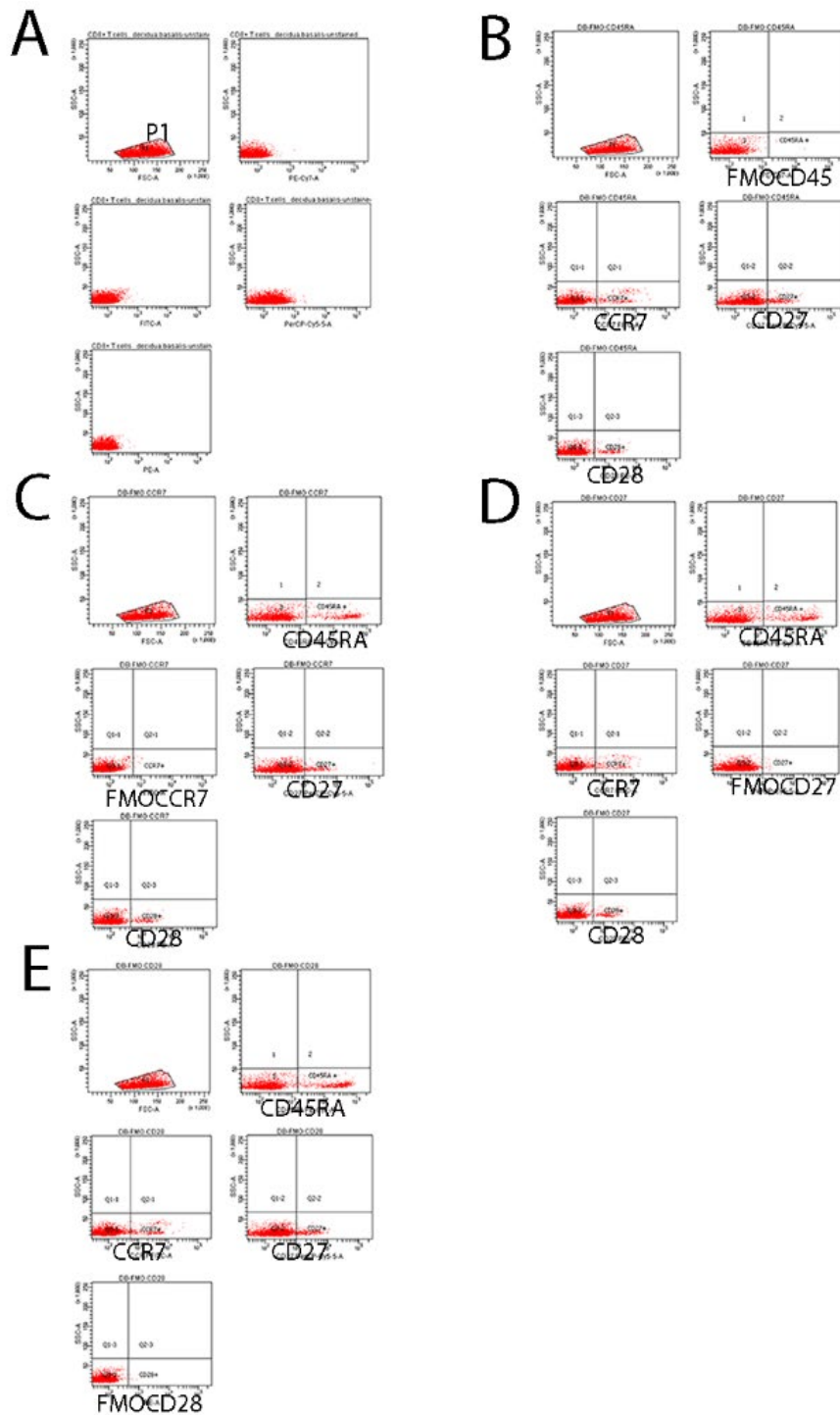


Slika 14. RT-qPCR promjena ekspresije mRNK FasL iz FFPE posteljice teške PE u usporedbi sa zdravim kontrolama. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. T test \*\*\* $p < 0,0001$ . Dijagram preuzet iz rada Vukoja, M.; Ćurlin, M.; Vukojević, K.; Jelić-Knezović, N.; Kolobarić, A.; Orlović Vlaho, M.; Šoljić, V. Effect of Granzyme K, FasL and Interferon- $\gamma$  Expression in Placentas with Preeclampsia. Biomedicines 2024, 12, 842. Licenca CC BY 4.0.



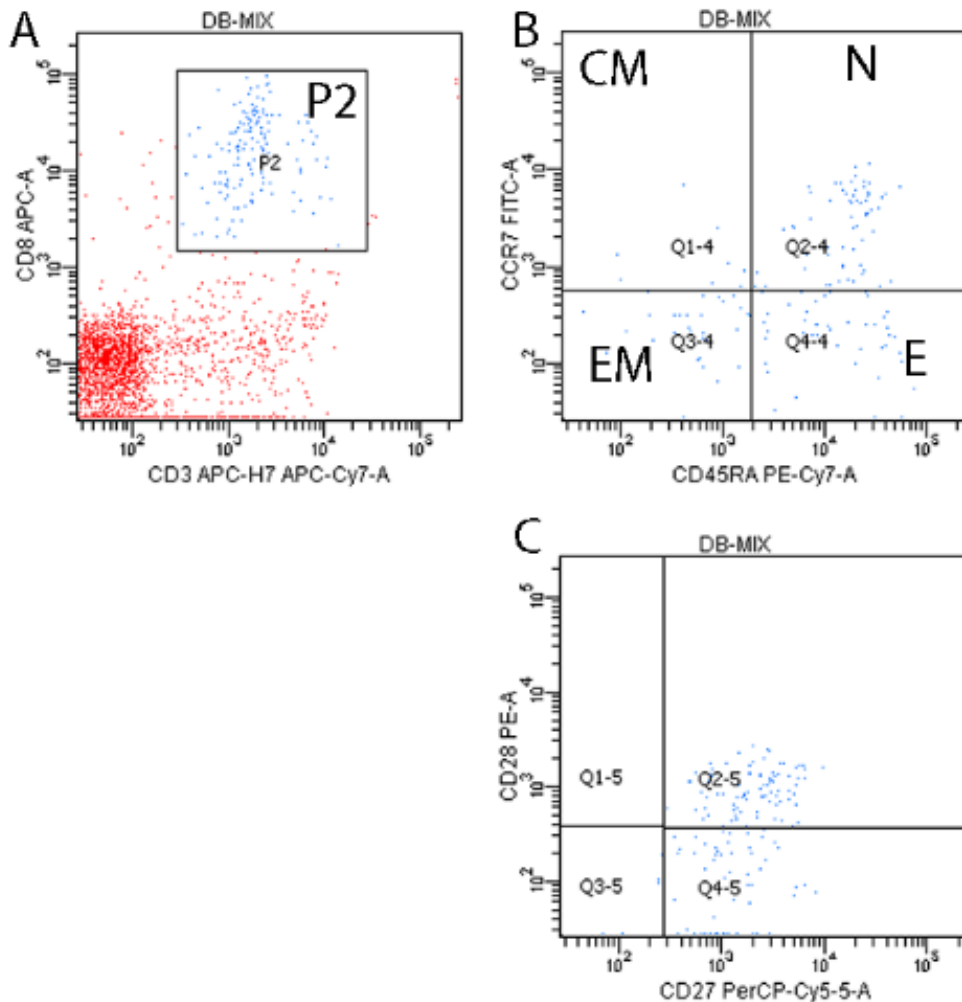
Slika 15. RT-qPCR promjena ekspresije mRNK IFN- $\gamma$  iz FFPE posteljice teške PE u usporedbi sa zdravim kontrolama. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. Mann-Whitney test. Vukoja, M.; Ćurlin, M.; Vukojević, K.; Jelić-Knezović, N.; Kolobarić, A.; Orlović Vlaho, M.; Šoljić, V. Effect of Granzyme K, FasL and Interferon- $\gamma$  Expression in Placentas with Preeclampsia. *Biomedicines* 2024, 12, 842. Licenca CC BY 4.0.

Pored imunofluorescentnog bojenja FFPE posteljičnog tkiva, izolirani su decidualni limfociti iz svježeg tkiva decidue basalis. Kao kontrola za izražaj ispitivanih biljega na protočnom citometru koristila se FMO (*fluorescence minus*) analiza (Slika 16.). Dot plotovi analize na protočnom citometru za ispitivanje biljege u CD8<sup>+</sup> T stanicama iz decidue basalis kontrolne posteljice i posteljice s PE prikazani su na slikama 17 i 18. Analiza na protočnom citometru pokazala je da je većina CD8<sup>+</sup> T stanica iz decidue basalis kod PE bila u naivnom (N) stanju, dok je u kontrolnoj grupi najzastupljenija subpopulacija bila efektor memorijskih (EM) stanica (Slika 19.).

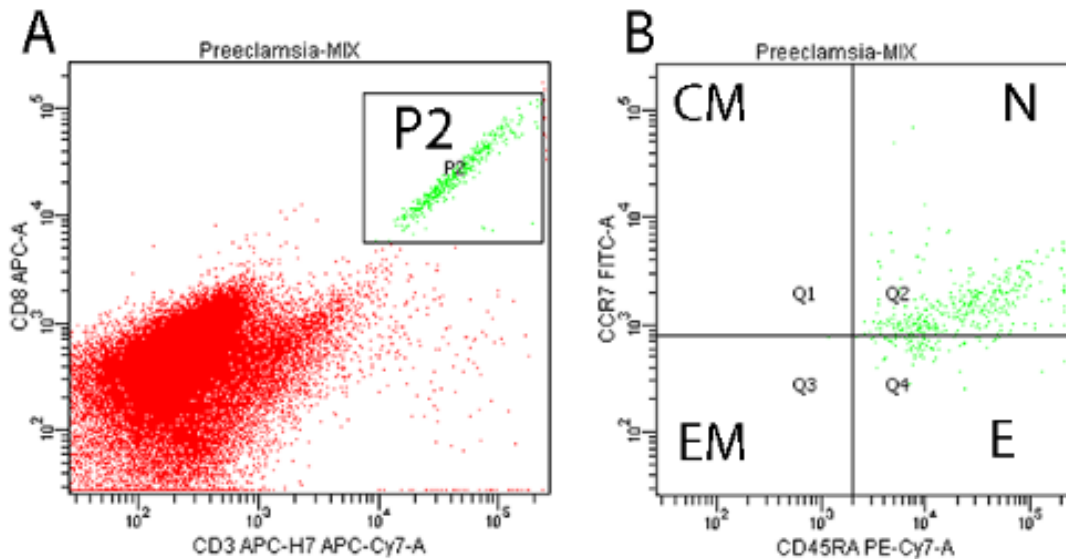


Slika 16. FMO kontrole za decidualne limfocite pripremljene su na isti način kao izotipske kontrole, ali bez dodavanja određenog fluorofor–konjugiranog antitijela. Gating za svaki kanal definiran je tako da isključi gotovo svu pozadinsku fluorescenciju iz nebojenog uzorka (A) i FMO kontrola, na primjer *fluorescence minus* CD45RA PE-Cy7 (B), *fluorescence minus* CCR7 FITC (C), *fluorescence minus* CD27 PerCP-Cy5.5 (D), *fluorescence minus* CD28 PE

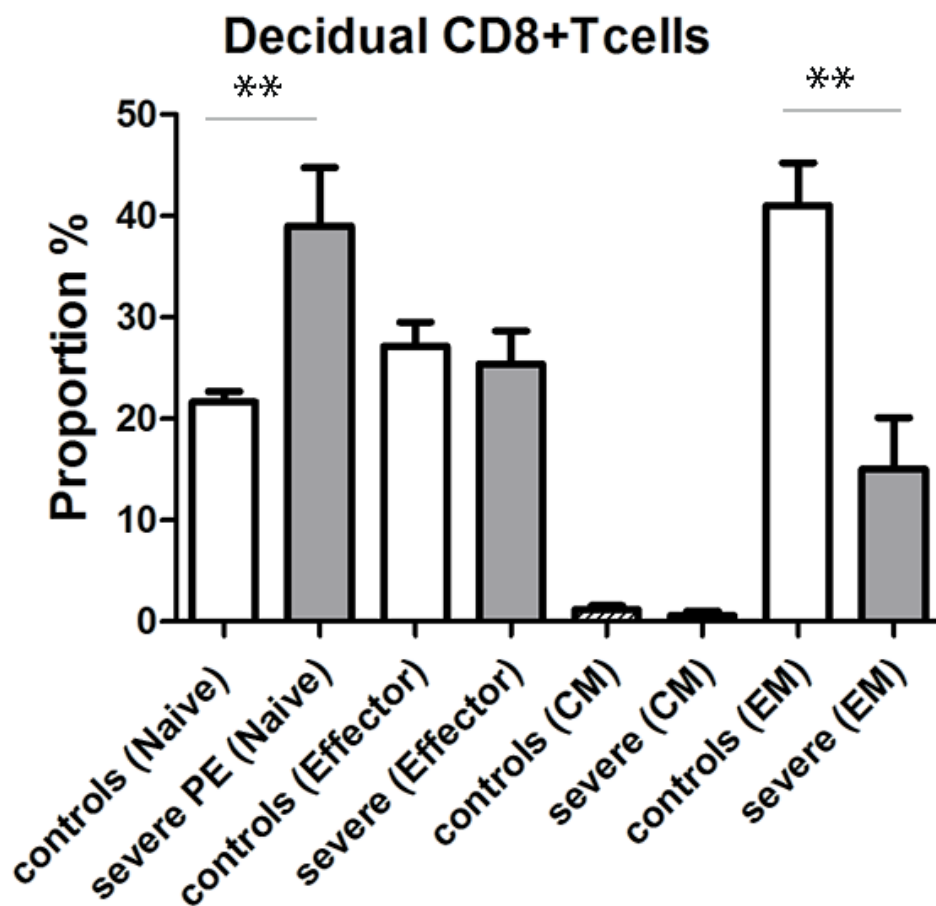
(E). Dijagram preuzet iz sustava za analizu podatka protočne citometrije BD FACSDiva softver.



Slika 17. Ekspresija površinskih biljega CD45RA, CCR7, CD27 i CD28 na ukupnim CD8+ T stanica iz decidue basalis kontrolne grupe. CD3+CD8+ T stanice u gejtu P2 (A) bile su razdvojene u četiri podskupine (naivne, CM, EM i efektorske) na osnovu obilježavanja CD45RA i CCR7 (B). CD3+CD8+ T stanice u gejtu P2 analizirane su na ko-ekspresiju CD27 i CD28 (C). Dijagram preuzet iz sustava za analizu podatka protočne citometrije BD FACSDiva softver.



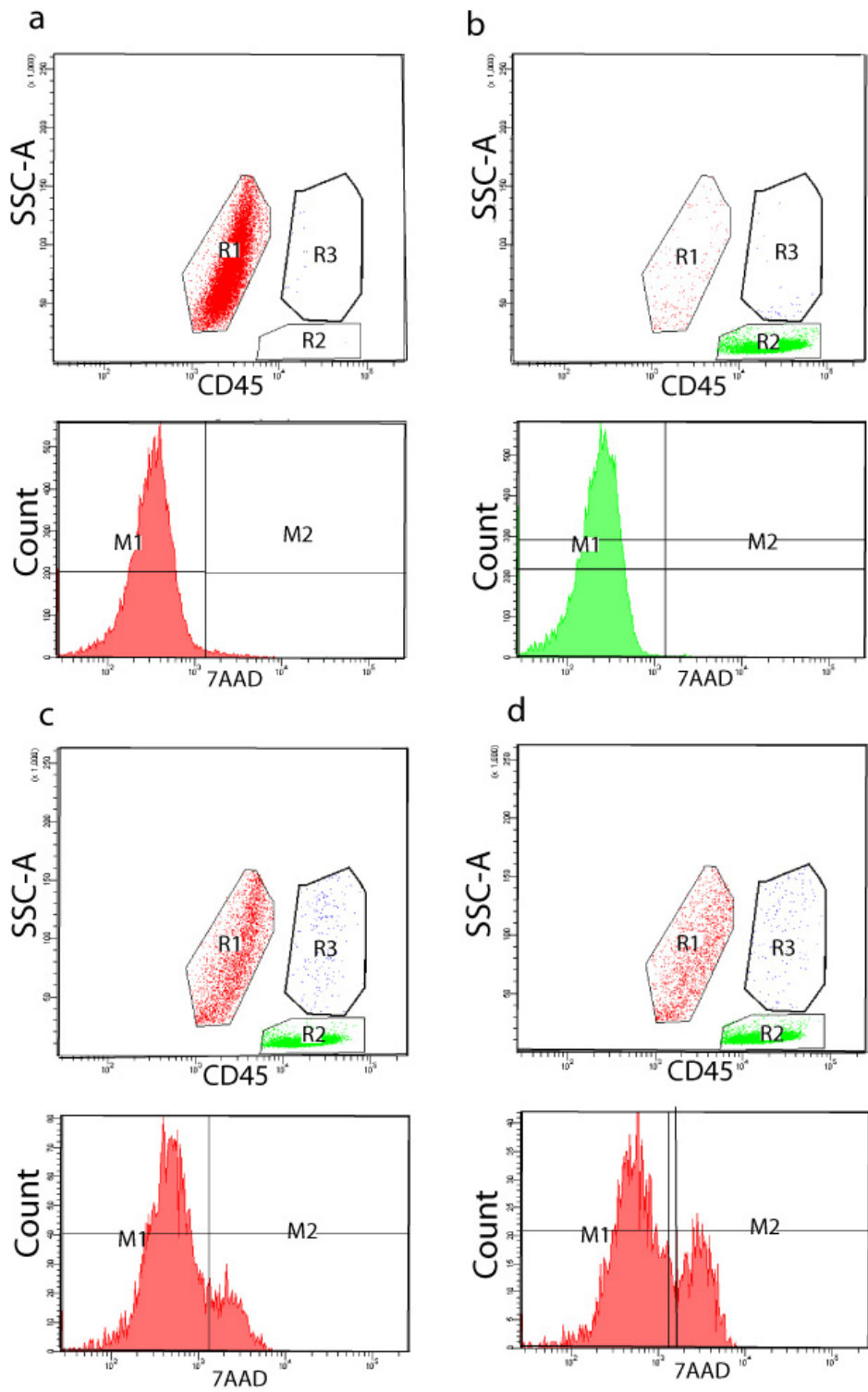
Slika 18. Ekspresija površinskih biljega CD45RA, CCR7, CD27 i CD28 na ukupnim CD8+ T stanicama iz decidue basalis kod teške PE. CD3+CD8+ T stanice u gejtju P2 (A) bile su razdvojene u četiri podskupine (naivne N, centralna memorija CM, efektorska memorija EM i efektorske E) na osnovu obilježavanja CD45RA i CCR7 (B). Dijagram preuzet iz sustava za analizu podatka protočnog citometra BD FACSDiva softver.



Slika 19. Udio naivnih, CM, efektorskih i EM CD8+ T stanica određen je u decidui basalis kontrolne grupe i grupe s teškom PE. Stupovi prikazuju prosječan postotak i standardnu devijaciju.  $**p < 0.01$ . Vukoja, M.; Ćurlin, M.; Vukojević, K.; Jelić-Knezović, N.; Kolobarić, A.; Orlović Vlaho, M.; Šoljić, V. Effect of Granzyme K, FasL and Interferon- $\gamma$  Expression in Placentas with Preeclampsia. *Biomedicines* 2024, 12, 842. Licenca CC BY 4.0.

Citotoksična aktivnost decidualnih limfocita kod pacijentica s preeklampsijom i u kontrolnoj skupini analizirana je detaljno. Razlikovanje ciljnih stanica, efektorskih stanica i konjugiranih stanica omogućeno je primjenom CD45 biljega u kombinaciji s analizom granuliranosti stanica. Ispitivana je varijacija i omjer između efektorskih i ciljnih stanica (E/T). U citometrijskoj analizi citotoksičnosti u kontrolnim uzorcima uključene su samo ciljne stanice K562 ili efektorske stanice. U tim uzorcima nije zabilježena pojava stanične smrti (Slika 20 a,b).

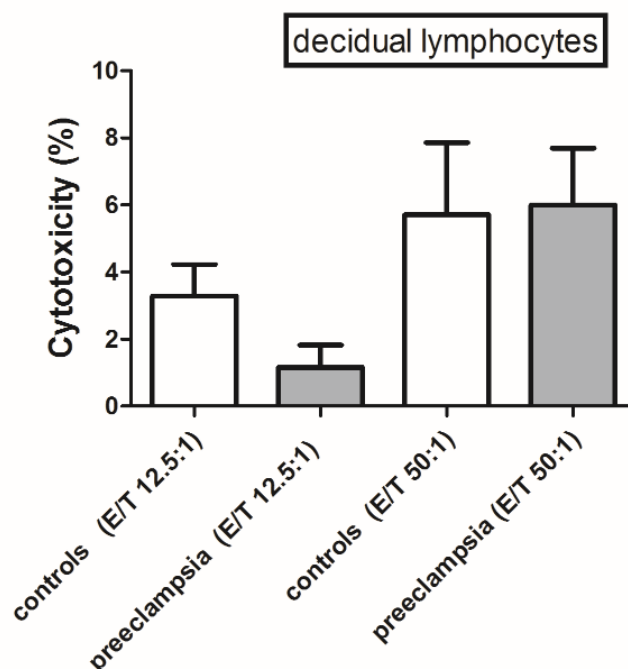
Efektorske i ciljne stanice miješane su u omjerima 12,5:1 i 50:1 za decidualne limfocite. Razina citotoksične aktivnosti decidualnih limfocita mijenjala se ovisno o omjeru efektorskih i ciljnih stanica (E/T 12,5:1 naspram 50:1) (Slika 20 c,d).



Slika 20. Mjerenje citotoksičnosti na protočnom citometru u kontrolnim uzorcima koji sadrže samo ciljane stanice K562 (CRVENO R1) (a) ili efektorske stanice (ZELENO R2) (b), uz korištenje bojenja PE-konjugiranim protutijelom za CD45 i viabilne 7-AAD boje za detekciju stanične smrti (M2). Efektorske stanice (R2) i ciljane stanice (R1) inkubirane su preko noći u miješanim kulturama u omjeru 12,5:1 (c) te u omjeru 50:1 (d), pri čemu se

također prikazuju konjugati između ciljnih i efektorskih stanica kao regija (R3). Dijagram preuzet iz sustava za analizu podataka protočnog citometra BD FACSDiva softver.

Postotak mrtvih stanica u regiji R1 izračunavao se iz histograma koji prikazuje unos 7-AAD u stanicu, mjereno intenzitetom crvene fluorescencije u M2. Međutim, nije utvrđena značajna razlika između skupine s preeklampsijom i kontrolne skupine (Slika 21).



Slika 21. Citotoksičnost decidualnih limfocita određena iz R1 pri E/T omjeru 12,5:1 i 50:1. Dijagram preuzet iz rada Vukoja, M.; Ćurlin, M.; Vukojević, K.; Jelić-Knezović, N.; Kolobarić, A.; Orlović Vlaho, M.; Šoljić, V. Effect of Granzyme K, FasL and Interferon- $\gamma$  Expression in Placentas with Preeclampsia. *Biomedicines* 2024, 12, 842. Licenca CC BY 4.0.

## **5. Rasprava**

Posteljica žena s preeklampsijom pokazuje značajne morfološke promjene, uključujući povećanu prisutnost infarkta, fibrinskih depozita, hijalinizacije i zadebljanje kapilara. Ove promjene odraz su poremećenog procesa trofoblastne invazije i remodeliranja spiralnih arterija, koje predstavlja ključnu patofiziološku komponentu preeklampsije (67). U tom kontekstu posebno je važna uloga izvanresičastog trofoblasta, jer upravo ove stanice ulaze u deciduu i transformiraju spiralne arterije (68). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je proteinska i mRNK ekspresija GZMK u izvanresičastom trofoblastima kod preeklampsije značajno povećana u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Granzim K (GZMK) je serinska proteaza prisutna u granulama citotoksičnih limfocita, iako njegova funkcija nije toliko dobro proučena kao funkcija granzima B. Prema dosadašnjim spoznajama se smatra kako granzimi sudjeluju u mehanizmima stanične smrti ciljnih stanica, no novija istraživanja ukazuju da GZMK također može regulirati upalne procese, imunološku signalizaciju i migraciju limfocita (57, 69). Uloga GZMK u izvanresičastom i resičastom trofoblastu posteljica žena s preeklampsijom dosad nije bila istraživana. Povećana ekspresija GZMK u preeklampsiji može odražavati pojačano upalno stanje u posteljici ili predstavljati kompenzacijski odgovor na poremećenu invaziju trofoblasta. Ovaj nalaz u skladu je s ranijim istraživanjima koja opisuju preeklampsiju kao stanje obilježeno izrazito aktiviranim, ali funkcionalno narušenim imunskim mikrookolišem, praćenim povišenom ekspresijom različitih upalnih medijatora.(42, 43, 70, 71) Nadalje, povećana ekspresija GZMK mogla bi ukazivati na pojačanu aktivaciju imunskih mehanizama ili stresni odgovor trofoblasta, što potencijalno doprinosi njihovoj disfunkciji i poremećenom razvoju posteljice.(57, 69)

GZMK prisutna u citotoksičnim granulama NK i CD8+ T stanica sudjeluje u induciranju apoptoze cijepanjem različitih supstrata, uključujući SET, Bid i p53, što potencijalno može ograničiti invaziju trofoblasta. U kontekstu preeklampsije, navedeni mehanizmi mogu biti povezani s hipoksičnim i oksidativno stresnim okolišem posteljice, pri čemu pojačana aktivacija GZMK može dodatno narušiti remodeliranje spiralnih arterija i posljedično utjecati na fetalni rast, uključujući pojavu intrauterinog zastoja rasta (IUGR) (69). U kontrolnim uzorcima blaga ekspresija GZMK vjerojatno doprinosi održavanju imunološke tolerancije na materno-fetalnom sučelju, dok u preeklampsiji pojačana citotoksična aktivnost može pridonositi nekrozi tkiva i stvaranju fibrinskih naslaga. Prethodno istraživanje provedeno na štakorima pokazalo je pozitivan učinak interleukina-17 na ekspresiju GZMK,

koja je u posteljici žena s PE značajno povišena (72). Nadalje, Travis i suradnici pokazali su da se razine GZMK značajno povećavaju u normalnih gravidnih štakora (73). Povećana ekspresija GZMK u posteljici također je zabilježena kod abrupcije placente, što može dovesti do teških krvarenja tijekom trudnoće (74).

GZMK osim što potiče apoptozu ciljnih stanica, može inducirati i upalne procese putem aktivacije citokina kao što su IL-1 $\beta$  i MCP-I (38). Ovaj upalni odgovor doprinosi poremećaju funkcije endotelne stanice u spiralnim arterijama, što dovodi do njihove disfunkcije i povećanog vaskularnog otpora. Takve patofiziološke promjene imaju važnu ulogu u razvoju hipertenzije i proinflammatornog imunološkog mikrookoliša karakterističnog za preeklampsiju (70).

Iako su FasL i pripadajući signalni putovi opsežno istraživani u kontekstu trudnoće i imunološke regulacije, njihova specifična uloga u preeklampsiji još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Tijekom normalne trudnoće FasL eksprimiran na trofoblastima može inducirati apoptozu majčinih imunoloških stanica koje eksprimiraju Fas receptor, čime doprinosi održavanju materno-fetalne tolerancije. Nasuprot tomu, u preeklampsiji je zabilježena pojačana apoptoza trofoblasta uz promijenjenu ekspresiju Fas/FasL sustava (63, 65, 75). Tijekom HELLP sindroma (hemoliza, povišeni jetreni enzimi i trombocitopenija) posteljica predstavlja važan izvor FasL, koji može pridonositi sustavnom upalnom odgovoru i oštećenju tkiva, a regulacija ovog signalnog puta narušena je u teškim oblicima preeklampsije (76). Rezultati ove disertacije pokazali su da je ekspresija FasL u izvanresičastom i resičastom trofoblastu posteljica žena s preeklampsijom bila blaga do umjerena, za razliku od kontrolnih posteljica u kojima je zabilježena umjerena do jaka ekspresija. Istodobno, razina mRNA FasL također je bila snižena u preeklampsiji u odnosu na kontrolnu skupinu. Prethodno istraživanje pokazalo je da neravnoteža u ekspresiji Fas i FasL u sincitiotrofoblastu žena s preeklampsijom može biti povezana s nastankom i razvojem ovog poremećaja. Rezultati ove disertacije također potvrđuju da je ekspresija FasL u preeklampsiji smanjena u odnosu na normalnu trudnoću, što je u skladu s ranijim istraživanjima (77). Snižena ekspresija FasL u preeklampsiji može pridonijeti poremećaju imunološke tolerancije na materno-fetalnom sučelju, pojačanoj upalnoj reaktivnosti i smanjenoj sposobnosti trofoblasta da održavaju imunološki povoljan mikrookoliš. Time se narušava sposobnost posteljice da inducira apoptozu aktiviranih imunoloških stanica koje bi potencijalno mogle ugroziti fetus (78). Narušavanje imunološke privilegije može potaknuti kroničnu upalu i oštećenje posteljice, što

se očituje pojačanom i dereguliranom apoptozom trofoblata posredovanom Fas signalnim putem. Time se dodatno narušava funkcija posteljice i povećava rizik razvoja kliničkih manifestacija preeklampsije (71).

Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) je jedan od ključnih citokina povezanih s regulacijom NK stanica i T stanica u trudnoći (49). Rezultati ove studije nisu pokazali značajne razlike u ekspresiji IFN- $\gamma$  između skupine s preeklampsijom i kontrolne skupine, što je u skladu s dijelom literature, iako pojedina istraživanja navode povišenu ekspresiju odnosno razine IFN- $\gamma$  u preeklampsiji. Povišene koncentracije IFN- $\gamma$  u posteljici mogu pridonijeti progresiji preeklampsije djelovanjem na invaziju trofoblata, remodeliranje spiralnih arterija, apoptozu trofoblata i angiogenezu (54, 79-81). Međutim, pojedina istraživanja nisu pokazala značajne razlike u razinama IFN- $\gamma$  između žena s preeklampsijom i zdravih trudnica (82, 83). Istraživanje koje je analiziralo povezanost serumskih koncentracija citokina u prvom tromjesečju trudnoće s razvojem preeklampsije pokazalo je da su razine IFN- $\gamma$  bile značajno povišene u skupini s preeklampsijom (84). Ova kontradiktornost može biti posljedica razlika u dizajnu studija, gestacijskoj dobi ispitanica, kriterijima za definiciju preeklampsije ili korištenim metodama detekcije. U kontekstu rezultata ove studije, izostanak značajne razlike upućuje na to da IFN- $\gamma$  vjerojatno nije ključni regulatorni čimbenik koji razlikuje normalnu od poremećene trudnoće, barem na razini placentarnog tkiva.

Decidualne CD8+ T stanice i decidualne NK stanice imaju ključnu ulogu u održavanju majčine imunološke tolerancije i razvoju posteljice tijekom trudnoće (28, 85). Za očuvanje kvalitetne obrane organizma protiv različitih štetnih čimbenika nužna je adekvatna aktivnost NK stanica i T limfocita. NK stanice učinkovito liziraju virusom zaražene, nezrele hematopoetske ili tumorski promijenjene stanice, neovisno o mehanizmu prepoznavanja (86). U izravnom kontaktu NK stanica i ciljane stanice, liza stanice posredovana je otpuštanjem topljivog faktora iz granula u međustanični prostor (87), a taj faktor uključuje perforin i granzime, koji aktiviraju kaspaze i dovode do programirane stanične smrti odnosno apoptoze (88). Međutim, specifična uloga citotoksične aktivnosti decidualnih limfocita u PE još uvijek nije dovoljno razjašnjena. Tijekom normalne trudnoće, decidualni limfociti čine 20–30% ukupnih limfocita u maternici te reguliraju majčinu imunološku toleranciju i razvoj posteljice (85). S druge strane, decidualne NK stanice imaju nisku citotoksičnost te izlučuju citokine i kemokine koji potiču invaziju trofoblata, remodeliranje tkiva, embrionalni razvoj i placentaciju (28). U patološkim trudnoćama, poput PE, poremećaji različitih čimbenika –

uključujući citokine, transkripcijske faktore, receptore za kemokine i mikroRNA povezane s T stanicama, mogu pridonijeti razvoju bolesti (89).

U ovom istraživanju, unatoč značajnim razlikama u ekspresiji GZMK i FasL u resičastom i izvanresičastom trofoblastu, citotoksična aktivnost decidualnih limfocita nije se statistički značajno razlikovala između skupine s preeklampsijom i kontrolne skupine. Ovaj nalaz mogao bi upućivati na to da promjene u ekspresiji citotoksičnih molekula u trofoblastima ne odražavaju nužno promjene u funkcionalnoj aktivnosti majčinskih imunoloških stanica. Iako je imunološka signalizacija u preeklampsiji izmijenjena, to ne znači nužno da su decidualne NK i CD8<sup>+</sup> T stanice funkcionalno hiperaktivne ili da uzrokuju pojačano oštećenje trofoblasta. Dobiveni rezultati nadovezuju se na sve veći broj istraživanja koja sugeriraju da je imunološka disregulacija u preeklampsiji manje povezana s pretjeranom citotoksičnošću, a više s neadekvatno usmjerenom ili poremećenom imunološkom regulacijom.(43)

Rezultati analize decidualnih limfocita protočnom citometrijom pružaju nove uvide u imunološke promjene na materno-fetalnom sučelju u teškoj preeklampsiji. Iako je poznato da preeklampsija uključuje složenu disregulaciju urođenog i stečenog imunskog sustava, uloga pojedinih podskupina CD8<sup>+</sup> T limfocita u patogenezi bolesti još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. (42, 43) Dobiveni podaci pružaju detaljniji uvid u diferencijacijski status CD8<sup>+</sup> T stanica, njihovu potencijalnu funkcionalnu aktivnost i mogući doprinos placentnoj disfunkciji.(36, 43) Protočna citometrija, provedena uz korištenje FMO (fluorescence minus one) kontrola za precizno određivanje granica gejtiranja, omogućila je jasno definiranje podskupina CD8<sup>+</sup> T stanica na temelju ekspresije biljega CD45RA, CCR7, CD27 i CD28. Ovakav metodološki pristup osigurao je visoku pouzdanost u razlikovanju naivnih stanica (N), stanica centralne memorije (CM), efektorskih memorijskih stanica (EM) i efektorskih stanica (E). Rezultati jasno pokazuju da se sastav CD8<sup>+</sup> T populacije u decidui značajno razlikuje između zdravih trudnica i trudnica s teškom preeklampsijom.

Najznačajniji rezultat ovog istraživanja bio je nalaz da su naivne CD8<sup>+</sup> T stanice bile dominantna subpopulacija u decidui žena s teškom preeklampsijom, dok su u kontrolnoj skupini prevladavale efektorske memorijske stanice (EM). Navedena razlika ukazuje na značajno promijenjenu imunološku dinamiku na materno-fetalnom sučelju u preeklampsiji. Naime, povećani udio naivnih T stanica sugerira da decidualni imunski sustav u preeklampsiji ostaje u funkcionalno nezrelom ili slabije aktiviranom stanju, što je donekle

ne očekivano s obzirom na poznatu povezanost preeklampsije s pojačanom upalom i aktivacijom imunološkog sustava.(43) Ovaj nalaz mogao bi se objasniti poremećenom diferencijacijom T stanica, smanjenom sposobnošću njihova zadržavanja u tkivu ili promjenama u mikrookolišu nužnom za njihovu aktivaciju i sazrijevanje. Suprotno tome, u zdravoj trudnoći dominacija efektorskih memorijskih stanica (EM) upućuje na postojanje funkcionalno adaptiranog imunološkog odgovora na materno-fetalnom sučelju. Ranija istraživanja pokazala su da decidualno tkivo fiziološke trudnoće sadrži pretežno diferencirane CD8+ EM stanice sa specifičnim funkcionalnim obilježjima prilagođenima lokalnom mikrookolišu. Ove stanice omogućuju učinkovitu lokalnu imunološku obranu uz istodobno održavanje tolerancije prema fetusu, što podupire rezultate ovog istraživanja u kojem su EM stanice bile dominantna populacija u decidui zdravih trudnica.(90)

Još jedan značajan nalaz ove studije jest smanjen udio efektorskih memorijskih (EM) i efektorskih (E) CD8+ T stanica u decidui žena s teškom preeklampsijom. Takvo smanjenje može imati više potencijalnih implikacija. Prije svega, upućuje na poremećenu diferencijaciju CD8+ T stanica u preeklampsiji, što može rezultirati smanjenom sposobnošću tkiva da adekvatno odgovori na stres ili infekciju. Nadalje, smanjena zastupljenost ovih funkcionalnih subpopulacija može pridonijeti narušavanju ravnoteže između proinflammatoryh i regulatornih mehanizama, čime se pogoduje razvoju patološkog i neadekvatno usmjerenog imunološkog odgovora karakterističnog za preeklampsiju.(43, 89)

Rezultati pokazuju da je udio CM stanica u obje skupine bio relativno nizak, što upućuje na mogućnost da ove stanice nemaju dominantnu ulogu u decidualnoj imunoregulaciji tijekom trudnoće. Međutim, ranija istraživanja pokazala su da su memorijske T-stanične podskupine, uključujući CD8+ centralne memorijske stanice, izmijenjene u decidui žena s preeklampsijom, osobito u ranoj PE. Stoga promjene u udjelu EM i naivnih CD8+ T stanica u ovom istraživanju mogu dodatno upućivati na poremećenu diferencijaciju i neadekvatnu imunološku adaptaciju na materno-fetalnom sučelju.(91)

Važno je istaknuti da ova studija ima određena ograničenja, uključujući relativno mali broj uzoraka, što može smanjiti statističku snagu za detekciju manjih, ali biološki relevantnih razlika. Nadalje, analiza citotoksične aktivnosti provedena je u jednom vremenskom trenutku, iako funkcija NK i CD8+ T stanica može značajno varirati tijekom trudnoće, što može utjecati na interpretaciju dobivenih rezultata. Dodatno ograničenje predstavlja činjenica da se

preeklampsija može manifestirati različitim fenotipovima, primjerice s ili bez intrauterinog zastoja rasta, pri čemu razlike između pojedinih podskupina nisu bile zasebno analizirane.

Unatoč navedenim ograničenjima, ova disertacija pruža vrijedne uvide u kompleksne imunološke interakcije na materno-fetalnom sučelju. Povećana ekspresija GZMK u izvanresičastom trofoblastu te smanjena ekspresija FasL upućuju na mogućnost da ovi proteini imaju važnu ulogu u patogenezi preeklampsije, osobito u procesima remodeliranja placentarnih krvnih žila. Istodobno, izostanak razlika u citotoksičnoj aktivnosti decidualnih limfocita sugerira da poremećaji u preeklampsiji nisu nužno posljedica pojačanog imunološkog napada na trofoblaste, već prije disbalansa u signalnim i regulatornim mehanizmima koji upravljaju međudjelovanjem majčinog imunskog sustava i fetalnih stanica. Sveukupno, rezultati ovog rada potvrđuju da je preeklampsija bolest obilježena dubokom, ali složenom imunološkom disregulacijom. Promjene u ekspresiji GZMK i FasL predstavljaju potencijalne biomarkere i moguće terapijske mete, no njihova precizna uloga u patogenezi bolesti zahtijeva daljnja istraživanja, uključujući longitudinalne studije, funkcionalne analize i stratifikaciju bolesnica prema različitim fenotipovima preeklampsije. Bolje razumijevanje ovih molekularnih mehanizama moglo bi pridonijeti ranijoj dijagnostici, učinkovitijim preventivnim strategijama i razvoju ciljanih terapijskih pristupa u budućnosti.

Dominacija efektorskih memorijskih CD8<sup>+</sup> T stanica u decidui kontrolne skupine upućuje na postojanje prethodno aktiviranog i funkcionalno adaptiranog imunološkog odgovora sposobnog za brzu reakciju na ponovni stimulacijski signal. Nasuprot tomu, smanjena zastupljenost ovih stanica u preeklampsiji mogla bi pridonijeti poremećenoj imunološkoj interakciji s trofoblastima te posljedično narušenoj invaziji trofoblasta i remodeliranju spiralnih arterija. Dobiveni rezultati sugeriraju da je teška preeklampsija povezana s poremećenom diferencijacijom i funkcionalnom organizacijom decidualnih CD8<sup>+</sup> T stanica, pri čemu imunološki profil poprima obilježja funkcionalne nezrelosti. Istodobno, izostanak povećane citotoksične aktivnosti dodatno podupire pretpostavku da je patofiziologija preeklampsije posljedica složene imunološke disregulacije, a ne isključivo pojačane citotoksičnosti.

Buduća istraživanja trebala bi se usmjeriti na longitudinalno praćenje ekspresije citotoksičnih molekula tijekom trudnoće kako bi se identificirali rani biomarkeri povezani s razvojem preeklampsije i njezinih komplikacija. Posebnu pozornost potrebno je posvetiti interakciji GZMK s drugim upalnim citokinima te mogućoj ulozi ovoga proteina kao terapijske mete.

Dodatno, uključivanje različitih fenotipova preeklampsije, uključujući trudnoće komplicirane intrauterinim zastojem rasta, moglo bi omogućiti preciznije razumijevanje specifičnih patofizioloških mehanizama bolesti. U kliničkom kontekstu, praćenje ekspresije GZMK i FasL moglo bi pridonijeti razvoju individualiziranog pristupa prevenciji i liječenju preeklampsije u visokorizičnih trudnoća.

## **6. Zaključci**

1. Posteljice žena s preeklampsijom pokazuju karakteristične patološke promjene uključujući nekrozu, fibrinske naslage, hijalinizaciju arterija i povećanu apoptozu trofoblasta, što potvrđuje disfunkciju posteljice kao ključnog čimbenika patogeneze PE.
2. U posteljica žena s PE dokazana je povećana genska i proteinska ekspresija GZMK u izvanresičastom trofoblastu (EVT) u odnosu na kontrole što ukazuje na njegovu ulogu u induciranju apoptoze i upalnih procesa uzrokovanih hipoksijom.
3. Ekspresija FasL značajno je smanjena na genskoj i proteinskoj razini u resičastom i izvanresičastom trofoblastu u posteljicama žena s PE, što narušava imunološki odgovor u posteljici i povećava apoptozu trofoblasta.
4. Nisu pronađene statistički značajne razlike u proteinskoj i genskoj ekspresiji IFN- $\gamma$  u izvanresičastom i resičastom trofoblastu što sugerira njegovu sekundarnu, modulirajuću ulogu u patogenezi PE.
5. Dominacija naivnih CD8<sup>+</sup> T stanica u decidui žena s preeklampsijom objašnjava izostanak povećane citotoksične aktivnosti, budući da ove stanice fiziološki nemaju razvijen efektorski potencijal. Ovakav fenotipski profil upućuje na to da se u preeklampsiji ne radi o pretjeranoj citotoksičnosti T limfocita, nego o njihovoj funkcionalnoj nezrelosti i poremećenoj diferencijaciji.
6. Pretpostavljamo da hipoksija inducira GZMK u EVT, što bez FasL kompenzacije dovodi do disregulacije imunološke ravnoteže te daljnje vaskularne disfunkcije spiralnih arterija.
7. GZMK se predlaže kao potencijalni biomarker u rizičnim trudnoćama, a modulacija citotoksičnosti (GZMK/FasL put) kao terapijski cilj za prevenciju komplikacija kod žena s PE.
8. Znanstveni doprinos: Rezultati su objavljeni u časopisu *Biomedicines* (2024, 12(4):842; DOI:10.3390/biomedicines12040842; IF=4,7) i čine temelj za buduća istraživanja longitudinalnih uzoraka, IUGR podgrupa i funkcionalnih in vitro modela imunopatogeneze PE.

## **7. Sažetak**

Ljudska posteljica sastoji se od dva tipa trofoblasta: recičasti i izvanresičasti trofoblast. Resičasti trofoblast (VT) omogućava prijenos plinova i hranjiva, dok izvanresičasti trofoblast (EVT) ulazi i remodelira krvne žile maternice, kako bi omogućio krvnu opskrbu hranjivih tvari fetusu. Abnormalna diferencijacija trofoblasta vodi do disfunkcije posteljice i povezana je s velikim brojem problema u trudnoći, kao što je preeklampsija (PE) i zaostajanje u fetalnom razvoju (13). Tijekom prvog tromjesečja trudnoće, trofoblast igra ključnu ulogu u angiogenetskim funkcijama, posebice u procesu pričvršćivanja na majčine spiralne arterije u miometriju. Zbog toga, poremećaj funkcije trofoblasta može rezultirati nizom nepovoljnih događaja u trudnoći, kao što su zaostajanje u razvoju, spontanim pobačajima, preuranjenim porođajem i PE (1).

Preeklampsija (PE) multisistemska je komplikacija trudnoće koja zahvaća 2-8% gestacija i glavni je uzrok majčinskog i fetalnog morbidnosti/mortaliteta. Dijagnosticira se pojavom iznenadne hipertenzije nakon 20. tjedna trudnoće s pojavom protenurije, disfunkcijom majčini organa ili disfunkcijom posteljice (2, 14). Patogeneza PE temelji se na nepravilnoj trofoblastnoj invaziji i remodeliranju spiralnih arterija maternice, što dovodi do hipoksije posteljice, oksidativnog stresa i sistemskog endotelnog oštećenja (23). Imunološki mehanizmi fetomaternalne tolerancije uključuju decidualne NK stanice (CD56+) i CD8 + T stanice, čiji citotoksični efektori, granzim K (GZMK), Fas ligand (FasL) i interferon gama (IFN- $\gamma$ ), reguliraju trofoblastnu diferencijaciju, migraciju i vaskularne promjene (92). Cilj istraživanja bio je utvrditi histološke promjene posteljica s PE, razlike u genskoj (mRNK) i proteinskoj ekspresiji GZMK, FasL i IFN- $\gamma$  u izvanresičastom i resičastom trofoblastu te citotoksičnost decidualnih limfocita kod žena s PE u usporedbi sa zdravim kontrolama.

Istraživanje je provedeno na 30 FFPE posteljica, 15 uzoraka posteljica žena s PE, 15 kontrola, te na decidualnim limfocitima iz svježeg tkiva decidue basalis uparenih po gestacijskoj dobi (PE: 34,8 $\pm$ 1,7 tjedana; kontrole: 34,5 $\pm$ 2,1 tjedana). Kod žena s PE prisutan je značajno viši krvni tlak (sistol. 167,6 $\pm$ 14,7 mmHg; dijast. 112 $\pm$ 11,4 mmHg; p<0,001), češći carski rezovi (93%; p=0,004), IUGR-om (73%; p=0,019) i povišeni jetreni enzimi (AST p=0,026; ALT p=0,034). Tijekom istraživanja korištene su različite metode poput hematoksilin-eozin za histološko bojanje tkiva, dvostruku imunofluorescenciju (GZMK/CD56, GZMK/CD8, FasL/CD56, FasL/CD8, IFN- $\gamma$ /CD56, IFN- $\gamma$  /CD8), Real-Time qPCR tehnologija za mRNK ekspresiju GZMK, FasL i IFN- $\gamma$  te test citotoksičnosti decidualnih limfocita korištenjem protočne citometrije (K562 ciljane stanice, E:T omjeri 1:2,5–50:1). Za statističku analizu korišten je Mann-Whitney U test, Shapiro-Wilk test normalnosti.

Rezultati pokazuju karakteristične promjene na posteljičnom tkivu žena s PE kao što su nekroze, fibrinske naslage, hijalinizaciju arterija i povećanu apoptozu trofoblasta. Istraživanje je pokazalo jaku ekspresiju GZMK u izvanresičasto trofoblastu u posteljicama žena s PE u usporedbi s kontrolnim posteljicama žena. Ekspresija FasL pokazala je blagi izražaj u resičastom trofoblastu u posteljicama žena s PE u usporedni s umjereno jakim izražajem u posteljicama žena s urednom trudnoćom. Ekspersija IFN- $\gamma$  ostaje nepromijenjena u trofoblastu. Citotoksičnost decidualnih limfocita bila je ista kod obje istraživane skupine. Posteljice žena s PE pokazale su u području decidue veći udio naivnih CD8 + T stanica.

Posteljice žena s PE u stanje hipoksije induciraju ekspresiju GZMK u EVT. Tijekom takvih stanja u posteljici ne dolazi do FasL kompenzacije koja štiti imunološku toleranciju. Veći udio naivne CD8+ T stanica u decidui basalis ukazuju na hiporeaktivnost stečenog imunološkog odgovora.

GZMK se predlaže kao potencijalni biomarker u rizičnim trudnoćama, a modulacija citotoksičnosti (GZMK/FasL put) kao mogući terapijski cilj za prevenciju komplikacija kod žena s PE. Buduća istraživanja trebaju uključiti longitudinalne uzorke, IUGR podgrupe i funkcionalne in vitro modele.

## **8. Laički sažetak**

Preeklampsija je ozbiljno patološko stanje u trudnoći koje pogađa 2-8% trudnica i glavni je uzrok problema s visokim krvnim tlakom, oštećenjem bubrega i jetara te zaostajanjem rasta fetusa. Ova bolest nastaje jer stanice posteljice ne prodiru dovoljno duboko u maternicu, što uzrokuje smanjenu opskrbu kisikom te vodi ka upalnim procesima u posteljici. Naš istraživanje analiziralo je 30 posteljica žena, 15 uzoraka posteljica žena s preeklampsijom, te 15 uzoraka posteljica žena s urednom trudnoćom, a sve u svrhu boljeg razumijevanja imunoloških promjena koje dovode do preeklampsije.

Otkrili smo da u posteljicama žena s preeklampsijom ima više granzima K, proteina koji uzrokuje smrt stanica posteljice i potiče upalne procese, što pogoršava stanje. Istovremeno, smanjena je ekspresija Fas ligand, molekula koji štiti fetus od majčinskog imunološkog sustava, pa majčin imunološki sustav nepravilno reagira na trudnoću. Interferon gama, imunološki signal, ostaje nepromijenjen, dok u posteljicama s preeklampsijom ima više nezrelih imunoloških T stanica koje ne mogu pravilno regulirati ravnotežu.

Rezultati su objavljeni u prestižnom međunarodnom časopisu *Biomedicines* (2024). Granzim K pokazuje se kao potencijalni rani biomarker za otkrivanje rizika u trudnoća, a razumijevanje ovih imunoloških mehanizama otvara mogućnosti za nova liječenja koja bi spriječila razvoj preeklampsije.

## **9. Summary**

The human placenta consists of two types of trophoblasts: villous and extravillous trophoblast. Villous trophoblast (VT) enables the transfer of gases and nutrients, while extravillous trophoblast (EVT) invades and remodels the uterine blood vessels to ensure adequate nutrient-rich blood supply to the fetus. Abnormal trophoblast differentiation leads to placental dysfunction and is associated with many pregnancy complications, such as preeclampsia (PE) and fetal growth restriction. During the first trimester of pregnancy, the trophoblast plays a key role in angiogenic functions, particularly in the process of attaching to the maternal spiral arteries in the myometrium. Therefore, disturbances in trophoblast function may result in a range of adverse pregnancy outcomes, including growth restriction, spontaneous abortions, preterm delivery and PE.

Preeclampsia (PE) is a multisystem pregnancy complication affecting 2–8% of gestations and is a major cause of maternal and fetal morbidity and mortality. It is diagnosed by the sudden onset of hypertension after the 20th week of pregnancy accompanied by proteinuria, maternal organ dysfunction, or placental dysfunction. The pathogenesis of PE is based on improper trophoblast invasion and inadequate remodeling of the uterine spiral arteries, leading to placental hypoxia, oxidative stress, and systemic endothelial damage. Immune mechanisms of fetomaternal tolerance involve decidual NK cells (CD56+) and CD8+ T cells, whose cytotoxic effectors—granzyme K (GZMK), Fas ligand (FasL), and interferon gamma (IFN- $\gamma$ )—regulate trophoblast differentiation, migration, and vascular changes. The aim of the study was to determine histological changes in placentas with PE, differences in gene (mRNA) and protein expression of GZMK, FasL, and IFN- $\gamma$  in extravillous and villous trophoblast, and the cytotoxicity of decidual lymphocytes in women with PE compared with healthy controls.

The study included 30 FFPE placentas—15 from women with PE and 15 controls—and decidual lymphocytes from fresh decidua basalis tissue matched by gestational age (PE: 34.8 $\pm$ 1.7 weeks; controls: 34.5 $\pm$ 2.1 weeks). Women with PE had significantly higher blood pressure (systolic 167.6 $\pm$ 14.7 mmHg; diastolic 112 $\pm$ 11.4 mmHg;  $p$ <0.001), more frequent cesarean deliveries (93%;  $p$ =0.004), intrauterine growth restriction (IUGR) (73%;  $p$ =0.019), and elevated liver enzymes (AST  $p$ =0.026; ALT  $p$ =0.034). Various methods were used, including hematoxylin–eosin tissue staining, double immunofluorescence (GZMK/CD56, GZMK/CD8, FasL/CD56, FasL/CD8, IFN- $\gamma$ /CD56, IFN- $\gamma$ /CD8), Real-Time qPCR for mRNA expression of GZMK, FasL, and IFN- $\gamma$ , and a decidual lymphocyte cytotoxicity assay

using flow cytometry (K562 target cells, E:T ratios 1:2.5–50:1). Statistical analysis included the Mann–Whitney U test and the Shapiro–Wilk test for normality.

The results show characteristic changes in placental tissue from women with PE, such as necrosis, fibrin deposits, arterial hyalinization, and increased trophoblast apoptosis. The study revealed strong GZMK expression in extravillous trophoblast in placentas from women with PE compared to controls. FasL expression showed a mild signal in villous trophoblast in PE placentas, compared with moderately strong expression in placentas from healthy pregnancies. IFN- $\gamma$  expression remained unchanged in trophoblast. Decidual lymphocyte cytotoxicity was similar in both groups. Placentas from women with PE displayed a higher proportion of naïve CD8<sup>+</sup> T cells in the decidua.

Placental hypoxia in PE induces GZMK expression in EVT. Under such conditions, there is no compensatory FasL expression, which normally maintains immune tolerance. A higher proportion of naïve CD8<sup>+</sup> T cells in the decidua basalis suggests hyporeactivity of the adaptive immune response.

GZMK is proposed as a potential biomarker in high-risk pregnancies, and modulation of cytotoxicity (the GZMK/FasL pathway) as a possible therapeutic target for preventing complications in women with PE. Future studies should include longitudinal sampling, IUGR subgroups, and functional in vitro models.

## **10. Lay summary**

Preeclampsia is a serious pathological condition in pregnancy that affects 2-8% of pregnant women and is the leading cause of problems with high blood pressure, kidney and liver damage, and fetal growth restriction. This disease occurs because placental cells do not penetrate deeply enough into the uterus, causing reduced oxygen supply and leading to inflammatory processes in the placenta. Our research analyzed 30 placentas from women—15 samples from women with preeclampsia and 15 samples from women with normal pregnancy—all aimed at better understanding the immunological changes that lead to preeclampsia.

We discovered that placentas from women with preeclampsia have more granzyme K, a protein that causes death of placental cells and promotes inflammatory processes, which worsens the condition. At the same time, Fas ligand expression is reduced—a molecule that protects the fetus from the mother's immune system—so the mother's immune system reacts incorrectly to the pregnancy. Interferon gamma, an immune signal, remains unchanged, while placentas with preeclampsia have more immature immune cells that cannot properly regulate balance.

The results were published in the prestigious international journal *Biomedicines* (2024). Granzyme K emerges as a potential early biomarker for detecting risk in pregnancies, and understanding these immunological mechanisms opens possibilities for new treatments that could prevent the development of preeclampsia.

## **11. Literatura**

1. Pollheimer J, Knöfler M. The role of the invasive, placental trophoblast in human pregnancy. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2012;162(9):187-90.
2. Wang T, Lian Y. The relationship between Fas and Fas ligand gene polymorphism and preeclampsia risk. *Bioscience Reports*. 2019;39(2).
3. Karrar SA, Martingano DJ, Hong PL. Preeclampsia. *StatPearls*. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Daniel Martingano declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Peter Hong declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2025.
4. Ness RB, Roberts JM. Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;175(5):1365-70.
5. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest*. 2004;114(6):744-54.
6. Renaud SJ, Jeyarajah MJ. How trophoblasts fuse: an in-depth look into placental syncytiotrophoblast formation. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(8):433.
7. Robbins JR, Skrzypczynska KM, Zeldovich VB, Kapidzic M, Bakardjiev AI. Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog*. 2010;6(1):e1000732.
8. Napso T, Yong HEJ, Lopez-Tello J, Sferruzzi-Perri AN. The Role of Placental Hormones in Mediating Maternal Adaptations to Support Pregnancy and Lactation. *Front Physiol*. 2018;9:1091.
9. Sadler TW, Kostović-Knežević L, Bradamante Ž, Švajger A, Banek L. *Langmanova medicinska embriologija: prijevod američkog izdanja: Školska knjiga*; 1996.
10. Kurjak A. *Ginekologija i perinatologija: Tonimir*; 2003.
11. Pare E, Parry S, McElrath TF, Pucci D, Newton A, Lim KH. Clinical risk factors for preeclampsia in the 21st century. *Obstet Gynecol*. 2014;124(4):763-70.
12. Kaplan C. Gross Examination of the Placenta. *Surg Pathol Clin*. 2013;6(1):1-26.
13. Farah O, Nguyen C, Tekkatte C, Parast MM. Trophoblast lineage-specific differentiation and associated alterations in preeclampsia and fetal growth restriction. *Placenta*. 2020;102:4-9.
14. Soljic V, Barbaric M, Vukoja M, Curlin M, Orlovic Vlaho M, Cerni Obrdalj E, et al. Decreased Expression of Cytotoxic Proteins in Decidual CD8(+) T Cells in Preeclampsia. *Biology*. 2021;10(10).
15. Kohan-Ghadr H-R, Kadam L, Jain C, Armant DR, Drewlo S. Potential role of epigenetic mechanisms in regulation of trophoblast differentiation, migration, and invasion in the human placenta. *Cell Adhesion & Migration*. 2016;10(1-2):126-35.
16. Nelissen EC, van Montfoort AP, Dumoulin JC, Evers JL. Epigenetics and the placenta. *Human reproduction update*. 2011;17(3):397-417.
17. Turbeville HR, Sasser JM. Preeclampsia beyond pregnancy: long-term consequences for mother and child. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2020;318(6):F1315-F26.
18. Currie G, Delles C. Proteinuria and its relation to cardiovascular disease. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2013;7:13-24.
19. Hladunewich M, Karumanchi SA, Lafayette R. Pathophysiology of the clinical manifestations of preeclampsia. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2(3):543-9.
20. Schoots MH, Gordijn SJ, Scherjon SA, van Goor H, Hillebrands JL. Oxidative stress in placental pathology. *Placenta*. 2018;69:153-61.
21. Guerby P, Tasta O, Swiader A, Pont F, Bujold E, Parant O, et al. Role of oxidative stress in the dysfunction of the placental endothelial nitric oxide synthase in preeclampsia. *Redox Biol*. 2021;40:101861.

22. Slawek-Szmyt S, Kawka-Paciorkowska K, Cieplucha A, Lesiak M, Ropacka-Lesiak M. Preeclampsia and Fetal Growth Restriction as Risk Factors of Future Maternal Cardiovascular Disease-A Review. *J Clin Med.* 2022;11(20).
23. Martini C, Saeed Z, Simeone P, Palma S, Ricci M, Arata A, et al. Preeclampsia: Insights into pathophysiological mechanisms and preventive strategies. *Am J Prev Cardiol.* 2025;23:101054.
24. Fox R, Kitt J, Leeson P, Aye CYL, Lewandowski AJ. Preeclampsia: Risk Factors, Diagnosis, Management, and the Cardiovascular Impact on the Offspring. *J Clin Med.* 2019;8(10).
25. Dahma G, Neamtu R, Nitu R, Gluhovschi A, Bratosin F, Grigoras ML, et al. The Influence of Maternal Vitamin D Supplementation in Pregnancies Associated with Preeclampsia: A Case-Control Study. *Nutrients.* 2022;14(15).
26. Bluman EM, Bartynski KJ, Avalos BR, Caligiuri MA. Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. *J Clin Invest.* 1996;97(12):2722-7.
27. Yue S, Meng J. Role of Decidual Natural Killer Cells in the Pathogenesis of Preeclampsia. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989).* 2025;93(1):e70033.
28. Zhang X, Wei H. Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications. *Front Immunol.* 2021;12:728291.
29. Fabbri M, Smart C, Pardi R. T lymphocytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(7):1004-8.
30. Adu-Berchie K, Obuseh FO, Mooney DJ. T Cell Development and Function. *Rejuvenation Res.* 2023;26(4):126-38.
31. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kedl RM. T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ.* 2013;37(4):273-83.
32. Kawabe T, Yi J, Sprent J. Homeostasis of Naive and Memory T Lymphocytes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2021;13(9).
33. Wyer JR, Willcox BE, Gao GF, Gerth UC, Davis SJ, Bell JI, et al. T cell receptor and coreceptor CD8 alphaalpha bind peptide-MHC independently and with distinct kinetics. *Immunity.* 1999;10(2):219-25.
34. Radziszewska A, Moulder Z, Jury EC, Ciurtin C. CD8(+) T Cell Phenotype and Function in Childhood and Adult-Onset Connective Tissue Disease. *Int J Mol Sci.* 2022;23(19).
35. Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *J Cell Physiol.* 2019;234(6):8509-21.
36. Gerritsen B, Pandit A. The memory of a killer T cell: models of CD8(+) T cell differentiation. *Immunol Cell Biol.* 2016;94(3):236-41.
37. Lauvau G, Soudja SM. Mechanisms of Memory T Cell Activation and Effective Immunity. *Adv Exp Med Biol.* 2015;850:73-80.
38. Turner SJ, Bennett TJ, La Gruta NL. CD8(+) T-Cell Memory: The Why, the When, and the How. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2021;13(5).
39. Zhu W, Li Y, Han M, Jiang J. Regulatory Mechanisms and Reversal of CD8(+)T Cell Exhaustion: A Literature Review. *Biology (Basel).* 2023;12(4).
40. Lin Y, Song Y, Zhang Y, Li X, Kan L, Han S. New insights on anti-tumor immunity of CD8(+) T cells: cancer stem cells, tumor immune microenvironment and immunotherapy. *J Transl Med.* 2025;23(1):341.

41. Loewendorf AI, Nguyen TA, Yesayan MN, Kahn DA. Normal human pregnancy results in maternal immune activation in the periphery and at the uteroplacental interface. *PLoS One*. 2014;9(5):e96723.
42. Taylor EB, Sasser JM. Natural killer cells and T lymphocytes in pregnancy and preeclampsia. *Clin Sci (Lond)*. 2017;131(24):2911-7.
43. van der Zwan A, Bi K, Norwitz ER, Crespo AC, Claas FHJ, Strominger JL, et al. Mixed signature of activation and dysfunction allows human decidual CD8(+) T cells to provide both tolerance and immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(2):385-90.
44. Molvarec A, Shiozaki A, Ito M, Toldi G, Stenczer B, Szarka A, et al. Increased prevalence of peripheral blood granulysin-producing cytotoxic T lymphocytes in preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2011;91(1-2):56-63.
45. Ng CT, Fong LY, Abdullah MNH. Interferon-gamma (IFN-gamma): Reviewing its mechanisms and signaling pathways on the regulation of endothelial barrier function. *Cytokine*. 2023;166:156208.
46. Naylor SL, Sakaguchi AY, Shows TB, Law ML, Goeddel DV, Gray PW. Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J Exp Med*. 1983;157(3):1020-7.
47. Hu X, Ivashkiv LB. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity*. 2009;31(4):539-50.
48. Liu H, Wang W, Liu C. Increased expression of IFN- $\gamma$  in preeclampsia impairs human trophoblast invasion via a SOCS1/JAK/STAT1 feedback loop. *Experimental and therapeutic medicine*. 2021;21(2):112.
49. Murphy SP, Tayade C, Ashkar AA, Hatta K, Zhang J, Croy BA. Interferon gamma in successful pregnancies. *Biol Reprod*. 2009;80(5):848-59.
50. Nurzadeh M, Ghalandarpoor-Attar SM, Ghalandarpoor-Attar SN, Rabiei M. The Role of Interferon (IFN)- $\gamma$  in Extravillous Trophoblast Cell (EVT) Invasion and Preeclampsia Progression. *Reproductive Sciences*. 2023;30(5):1462-9.
51. Lash GE, Otun HA, Innes BA, Kirkley M, De Oliveira L, Searle RF, et al. Interferon-gamma inhibits extravillous trophoblast cell invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels. *FASEB J*. 2006;20(14):2512-8.
52. Hu Y, Tan R, MacCalman CD, Eastabrook G, Park SH, Dutz JP, et al. IFN-gamma-mediated extravillous trophoblast outgrowth inhibition in first trimester explant culture: a role for insulin-like growth factors. *Mol Hum Reprod*. 2008;14(5):281-9.
53. Otun HA, Lash GE, Innes BA, Bulmer JN, Naruse K, Hannon T, et al. Effect of tumour necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma on first trimester extravillous trophoblast invasion. *J Reprod Immunol*. 2011;88(1):1-11.
54. Sheibak N, Mahmoudzadeh-Sagheb H, Moudi B, Heidari Z. Elevated immunoexpression of interferon-gamma in placenta tissue samples from pregnancies complicated with preeclampsia compared to the placenta previa. *Pregnancy Hypertension*. 2020;22:175-80.
55. Banerjee S, Smallwood A, Moorhead J, Chambers AE, Papageorghiou A, Campbell S, et al. Placental expression of interferon-gamma (IFN-gamma) and its receptor IFN-gamma R2 fail to switch from early hypoxic to late normotensive development in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(2):944-52.
56. Wilharm E, Parry MA, Friebel R, Tschesche H, Matschiner G, Sommerhoff CP, et al. Generation of catalytically active granzyme K from *Escherichia coli* inclusion bodies and identification of efficient granzyme K inhibitors in human plasma. *J Biol Chem*. 1999;274(38):27331-7.
57. Bouwman AC, van Daalen KR, Crnko S, Ten Broeke T, Bovenschen N. Intracellular and Extracellular Roles of Granzyme K. *Front Immunol*. 2021;12:677707.

58. Bovenschen N, Quadir R, van den Berg AL, Brenkman AB, Vandenberghe I, Devreese B, et al. Granzyme K displays highly restricted substrate specificity that only partially overlaps with granzyme A. *J Biol Chem*. 2009;284(6):3504-12.
59. Plasman K, Maurer-Stroh S, Ahmad J, Hao H, Kaiserman D, Sirota FL, et al. Conservation of the extended substrate specificity profiles among homologous granzymes across species. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12(10):2921-34.
60. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*. 2009;30(2):180-92.
61. Trambas CM, Griffiths GM. Delivering the kiss of death. *Nat Immunol*. 2003;4(5):399-403.
62. Lan R, Yang Y, Song J, Wang L, Gong H. Fas regulates the apoptosis and migration of trophoblast cells by targeting NF-kappaB. *Experimental and therapeutic medicine*. 2021;22(4):1055.
63. Kauma SW, Huff TF, Hayes N, Nilkaeo A. Placental Fas ligand expression is a mechanism for maternal immune tolerance to the fetus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(6):2188-94.
64. Hsu CD, Harirah H, Basherra H, Mor G. Serum soluble Fas levels in preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2001;97(4):530-2.
65. Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2000;96(2):271-6.
66. Roberts JM, Escudero C. The placenta in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2012;2(2):72-83.
67. Kornacki J, Olejniczak O, Sibiak R, Gutaj P, Wender-Ozegowska E. Pathophysiology of Pre-Eclampsia-Two Theories of the Development of the Disease. *Int J Mol Sci*. 2023;25(1).
68. Wei XW, Zhang YC, Wu F, Tian FJ, Lin Y. The role of extravillous trophoblasts and uterine NK cells in vascular remodeling during pregnancy. *Front Immunol*. 2022;13:951482.
69. Xin C, Liu P, Zhan Q, Cao W. Gzmk(+) CD8 T cells in inflammatory diseases. *Front Immunol*. 2025;16:1661755.
70. Murthi P, Pinar AA, Dimitriadis E, Samuel CS. Inflammasomes-A Molecular Link for Altered Immunoregulation and Inflammation Mediated Vascular Dysfunction in Preeclampsia. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4).
71. Raguema N, Moustadraf S, Bertagnolli M. Immune and Apoptosis Mechanisms Regulating Placental Development and Vascularization in Preeclampsia. *Front Physiol*. 2020;11:98.
72. Toldi G, Rigo J, Jr., Stenczer B, Vasarhelyi B, Molvarec A. Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in pre-eclampsia. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)*. 2011;66(3):223-9.
73. Travis OK, White D, Pierce WA, Ge Y, Stubbs CY, Spradley FT, et al. Chronic infusion of interleukin-17 promotes hypertension, activation of cytolytic natural killer cells, and vascular dysfunction in pregnant rats. *Physiol Rep*. 2019;7(7):e14038.
74. Warren BB, Moyer GC, Manco-Johnson MJ. Hemostasis in the Pregnant Woman, the Placenta, the Fetus, and the Newborn Infant. *Semin Thromb Hemost*. 2023;49(4):319-29.
75. Karthikeyan VJ, Lip GY, Baghdadi S, Lane DA, Beevers DG, Blann AD. Soluble Fas and Fas ligand in pregnancy: influence of hypertension. *Angiology*. 2012;63(1):35-8.
76. Strand S, Strand D, Seufert R, Mann A, Lotz J, Blessing M, et al. Placenta-derived CD95 ligand causes liver damage in hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count syndrome. *Gastroenterology*. 2004;126(3):849-58.
77. Rešić Karara J, Zekić Tomas S, Marušić J, Roje D, Kuzmić Prusac I. Fas and FasL expression in placentas complicated with intrauterine growth retardation with and without

- preeclampsia. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet.* 2016;29(7):1154-9.
78. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Mor G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr Rev.* 2005;26(7):877-97.
79. Yang Y, Su X, Xu W, Zhou R. Interleukin-18 and interferon gamma levels in preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989).* 2014;72(5):504-14.
80. Banerjee S, Smallwood A, Moorhead J, Chambers AE, Papageorgiou A, Campbell S, et al. Placental Expression of Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and Its Receptor IFN- $\gamma$ R2 Fail to Switch from Early Hypoxic to Late Normotensive Development in Preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2005;90(2):944-52.
81. Zhang L, Wang Y, Liao A-H. Quantitative abnormalities of fetal trophoblast cells in maternal circulation in preeclampsia. *Prenatal Diagnosis.* 2008;28(12):1160-6.
82. Cemgil Arıkan D, Aral M, Coskun A, Ozer A. Plasma IL-4, IL-8, IL-12, interferon-gamma and CRP levels in pregnant women with preeclampsia, and their relation with severity of disease and fetal birth weight. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet.* 2012;25(9):1569-73.
83. Kronborg CS, Gjedsted J, Vittinghus E, Hansen TK, Allen J, Knudsen UB. Longitudinal measurement of cytokines in pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2011;90(7):791-6.
84. Vafaei H, Faraji S, Ahmadi M, Tabei SMB, Fereidoni S, Shiravani Z, et al. Alteration in IFN-gamma and CCL2 serum levels at first trimester of pregnancy contribute to development of preeclampsia and fetal growth restriction. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2023;62(1):71-6.
85. Vijayan M, Lee CL, Wong VHH, Wang X, Bai K, Wu J, et al. Decidual glycodefin-A polarizes human monocytes into a decidual macrophage-like phenotype through Siglec-7. *J Cell Sci.* 2020;133(14).
86. Theresine M, Patil ND, Zimmer J. Airway Natural Killer Cells and Bacteria in Health and Disease. *Front Immunol.* 2020;11:585048.
87. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood.* 2010;115(11):2167-76.
88. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:389-420.
89. Zolfaghari MA, Arefnezhad R, Parhizkar F, Hejazi MS, Motavalli Khiavi F, Mahmoodpoor A, et al. T lymphocytes and preeclampsia: The potential role of T-cell subsets and related MicroRNAs in the pathogenesis of preeclampsia. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989).* 2021;86(5):e13475.
90. Tilburgs T, Schonkeren D, Eikmans M, Nagtzaam NM, Datema G, Swings GM, et al. Human decidual tissue contains differentiated CD8<sup>+</sup> effector-memory T cells with unique properties. *J Immunol.* 2010;185(7):4470-7.
91. Kieffer TEC, Laskewitz A, Vledder A, Scherjon SA, Faas MM, Prins JR. Decidual memory T-cell subsets and memory T-cell stimulatory cytokines in early- and late-onset preeclampsia. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989).* 2020;84(4):e13293.

92. Qiu Y, Chen M, Lin R, Chen X, He L, Yin H, et al. Crosstalk between decidual natural killer cells and extravillous trophoblasts at the maternal-fetal interface: current status and future perspectives. *Front Immunol.* 2025;16:1703156.

## **12. Životopis**

## **OSOBI PODATCI**

Ime i prezime: Martina (rođ.Medo) Vukoja

Mjesto i datum rođenja: Livno, 23. siječnja 1994. godine

Državljanstvo: bosansko hercegovačko i hrvatsko

e-mail adresa: [martina.vukoja@mef.sum.ba](mailto:martina.vukoja@mef.sum.ba)

## **IZOBRAZBA**

2020.god.- danas-Poslijediplomski doktorski studij Biologija novotvorina, Medicinski fakultet u Splitu, Sveučilište u Splitu

2015.-2017.-Diplomski studij Biologije i Kemije, Fakultet prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti, Sveučilište u Mostaru

2012.-2015.- Preddiplomski studij Biologije i Kemije, Fakultet prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti, Sveučilište u Mostaru

2008.-2012. Opća gimnazija Livno

## **NAGRADE I PRIZNANJA**

2016. Dekanova nagrada za vannastavne aktivnosti

2017. Priznanje za izniman doprinos studentskog časopisa „Eureka“

## **RADNO ISKUSTVO**

2018.-danas – Biolog u Citogenetičkom laboratoriju pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Mostaru

2024.-danas- viši asistent na Katedri za biologiju stanice, Katedri za medicjnsku genetiku, Katedri za fizologiju bilja, Katedri za opću ekologiju pri fakultetima MEF, FZS, FPMOZ, FF

2018.-2024.- asistent na Katedri za biologiju stanice, Katedri za medicjnsku genetiku, Katedri za fizologiju bilja, Katedri za opću ekologiju pri fakultetima MEF, FZS, FPMOZ, FF

2017.-2018.- vanjski suradnik , Katedri za fizologiju bilja, Katedri za opću ekologiju pri fakultetu FPMOZ

2017.-2018.-nastavnica biologije u OŠ „Fra Lovro Karaula“ u Livnu

### **PROFESIONALNO USAVRŠAVANJE**

2024. Završen tečaj za korištenje ASI sustava za FISH analize

2023 Labena academy: Labena tissue FISH analysis,.

2023. Završen tečaj genskog kloniranja i dizajniranja u in silico uvjetima

2023. Završen tečaj za korištenje ddPCR

2019. Labena academy: Labena Biomedical Imaging Workshop

2016 Održivi razvoj: Obrada sanitarnih voda

2016. Završen tečaj njemačkog jezika i tečaj informatike

### **ZNANSTVENE PUBLIKACIJE**

1. 2024. Urlić, I.; Šoljić, V.; Vukoja, M.; Marijanović, I.; Kraljević, M.; Urlić, M.; Marić, S.; Vukojević, K.; Filipović, N. Identifying an Inversin as a Novel Prognostic Marker in Patients with Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 12120. <https://doi.org/10.3390/ijms252212120>
2. 2024. Šitum Čepnija, Z.; Kelam, N.; Ogorevc, M.; Racetin, A.; Vukoja, M.; Čepnija, T.; Filipović, N.; Saraga-Babić, M.; Vukojević, K. Expression of LOXL3, NES, and SNAI1 in Melanoma Genesis and Progression. *Cells* 2024, 13, 1450. <https://doi.org/10.3390/cells13171450>
3. 2024. Vukoja, M.; Ćurlin, M.; Vukojević, K.; Jelić-Knezović, N.; Kolobarić, A.; Orlović Vlaho, M.; Šoljić, V. Effect of Granzyme K, FasL and Interferon- $\gamma$  Expression in Placentas with Preeclampsia. *Biomedicines* 2024, 12, 842. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12040842>
4. 2024. Tomić, T.; Tomić, D.; Vukoja, M.; Kraljević, M.; Ljevak, I.; Glamočlija, U.; Tomić, V.; Vukojević, K.; Beljan Perak, R.; Šoljić, V. Clinical Significance and Expression Pattern of RIP5 and VGLL4 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients Treated with Sunitinib. *Biomedicines* 2024, 12, 149. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12010149>
5. 2023. Kokeza, J.; Strikic, A.; Ogorevc, M.; Kelam, N.; Vukoja, M.; Dilber, I.; Zekic Tomas, S. The Effect of GLUT1 and HIF-1 $\alpha$  Expressions on Glucose Uptake and

Patient Survival in Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 10575.

<https://doi.org/10.3390/ijms241310575>

6. 2023. Veljačić Visković, D.; Lozić, M.; Vukoja, M.; Šoljić, V.; Vukojević, K.; Glavina Durdov, M.; Filipović, N.; Lozić, B. Spatio-Temporal Expression Pattern of CAKUT Candidate Genes DLG1 and KIF12 during Human Kidney Development. *Biomolecules* 2023, 13, 340. <https://doi.org/10.3390/biom13020340>
7. 2021. Ramljak, D.; Vukoja, M.; Curlin, M.; Vukojevic, K.; Barbaric, M.; Glamoclija, U.; Purisevic, B.; Peric, O.; Soljic, V. Early Response of CD8+ T Cells in COVID-19 Patients. *J. Pers. Med.* 2021, 11, 1291. <https://doi.org/10.3390/jpm11121291>
8. 2021. Soljic, V.; Barbaric, M.; Vukoja, M.; Curlin, M.; Orlovic Vlaho, M.; Cerni Obrdalj, E.; Lasic Arapovic, L.; Bevanda Glibo, D.; Vukojevic, K. Decreased Expression of Cytotoxic Proteins in Decidual CD8+ T Cells in Preeclampsia. *Biology* 2021, 10, 1037. <https://doi.org/10.3390/biology10101037>