

MEDICINSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

ŽELJKO DUIĆ

LIJEČENJE INFERTILITETA UZROKOVANOG HLA-D
STATUSOM RODITELJA

DOKTORSKA DISERTACIJA

ZAGREB, veljača 2003. godine

Doktorska disertacija izrađena je u Klinici za ženske bolesti i porode
KB “Merkur”

Voditelj rada: prof. dr. sci. Mario Podobnik

Rad ima 117 listova

Redni broj rada _____

SADRŽAJ

UVOD	2
EPIDEMIOLOŠKI ČIMBENICI	4
GENETSKI UZROCI	4
ANATOMSKI POREMEĆAJI	5
ENDOKRINOLOŠKI UZROCI	7
OKOLIŠNI UČINCI	11
MIKROBIOLOŠKI UZROCI	12
IMUNOLOŠKI UZROCI	12
CILJ ISTRAŽIVANJA	27
ISPITANICE I POSTUPAK	28
REZULTATI	32
RASPRAVA	35
ZAKLJUČCI	68
SAŽETAK	69
SUMMARY	71
LITERATURA	

U V O D

Prema tradicionalnoj definiciji spontani je pobačaj svaki neželjeni gubitak trudnoće do navršenih 28. tjedana trudnoće. Posljednjih desetljeća mijenja se, međutim ova definicija (1).

U Velikoj Britaniji pobačaj se definira kao spontani gubitak trudnoće do 24. tjedna trudnoće (2). Biološka definicija pobačaja jest istiskivanje ploda iz maternice prije nego je on sposoban za život. Alternativna epidemiološka definicija smatra pobačajem istiskivanje ploda iz majke lakšega od 500 grama ili kraćega od 25 cm, što odgovara otprilike 20. do 22. tjednu trudnoće (3). Fetalna se vijabilnost postiže u samo 30% svih ljudskih koncepcija/zanošenja, dok se 50% ljudskih zametaka izgubi prije prve izostale menstruacije (4). U ljudi se približno 25% implantiranih embrija resorbira unutar 7-14 dana nakon pričvršćenja/doticanja endometrija (5). Učestalost spontanih pobačaja iznosi 15% svih klinički prepoznatih trudnoća (6,7). Pravu učestalost spontanih pobačaja teško je utvrditi. Uporabom osjetljivih testova za određivanje beta lanca humanoga korionskog gonadotropina nađeno je da stopa pobačaja iznosi čak 50% (8) do 75% (9). Najmanje 15% oplođenih jajašaca propadne prije implantacije. Smatra se da je broj vrlo rano pobačenih zametaka u klinički prepoznatim trudnoćama 12 do 15% (4,10,11). Međutim, samo 3% urednih trudnoća u osmom tjednu gestacije u kasnijem tijeku rezultiraju pobačajem, što se obično dogodi oko 14. do 16. tjedna trudnoće (12). Rizik pobacivanja u prvoj trudnoći iznosi oko 10%, povećava se u trudnoćama koje slijede, u drugoj na 24% , u trećoj na 26% i četvrtoj na 32% (13)

Tri ili više uzastopnih spontanih pobačaja s istim partnerom nazivaju se habitualnim pobacivanjem. Razlikujemo primarne pobacilje, žene s tri i više uzastopna spontana pobačaja, bez uspješno završene trudnoće, i sekundarne pobacilje, žene s tri i više uzastopna spontana pobačaja nakon bar jednog poroda živog djeteta. U anglosaksonskoj literaturi sinonimi su: recurrent miscarriage, habitual miscarriage, habituale abortion or recurrent abortion i podrazumijevaju gubitak tri ili više uzastopne trudnoće prije 24. tjedna gestacije/trudnoće. Međutim, recurrent spontaneous abortion (RSA) definira se kao gubitak dva ili više, ili čak tri ili više, klinički detektabilne trudnoće bez obzira na tjedan trudnoće (14).

U oko 50% klinički prepoznatih pobačaja od 6. do 13. tjedna nakon koncepcije (8. do 15. tjedna nakon posljednje menstruacije) uzrok je aneuploidija kod ploda. Učestalost spontanih pobačaja uzrokovanih abnormalnošću kromosoma u trudnoća do petoga tjedna nakon koncepcije samo je 14 do 25% (6). Taj podatak upozorava na mogućnost da kod tih vrlo ranih spontanih pobačaja negenetski čimbenici igraju važnu ulogu kod implantacije jajašca ili neposredno nakon implantacije.

Učestalost genetskog uzroka pobacivanju kod parova s tri i više uzastopnih spontanih pobačaja iznosi 6 do 8% (6,15) prema jednim autorima, dok prema drugima iznosi čak 40% (16) i 57% s time da je isti postotak kromosomalnih abnormalnosti nađen u pobačenih plodova žena bez anamneze habitualnog pobacivanja (17). Vjerojatnost da će žena imati tri ili više uzastopnih spontanih

pobačaja iznosi 0,3 do 0,4%; međutim, stvarna učestalost habitualnih pobačaja iznosi 0,4 do 0,8% (7).

Povećana je prevalencija habitualnih pobačaja među rođacima prve linije, što pretpostavlja postojanje obiteljske predispozicije za habitualno pobacivanje (18).

Dosadašnjim rutinskim metodama detekcije uzrok habitualnom pobačaju ostaje najčešće nepoznat u čak 40 do 50% svih ispitanica koje habitualno pobacuju (6,7). Singer i suradnici, koristeći se suvremenim metodama, ne nalaze uzroke u 12% habitualnih pobačaja (15). Uzroci habitualnih pobačaja su u 1-28% slučajeva anatomske, insuficijencija žutog tijela 3%-20%-40%, a infekcija 1%-15%-48% (18).

Ako je žena imala jedan do dva pobačaja, vjerojatnost za uspješnu sljedeću trudnoću iznosi do 80%. Vjerojatnost da žena, primarna pobacilja uspješno, bez liječenja, iznese sljedeću trudnoću iznosi od 40 do 75%, ovisno o broju pobačaja. (6,12, 19, 20).

Vjerojatnost da žena sekundarni aborter uspješno, bez liječenja, donese živo dijete iznosi 70% (6). Vjerojatnost da će žena koja nije imala neuspjelih trudnoća pobaciti iznosi 12%, dok se ta vjerojatnost kod žena koje su habitualno pobacivale penje na 25 do 50% (12).

Do 40% fetalnog gubitka preostaje kao posljedica neobjašnjene etiologije (21). Na mogućnost imunološkog uzroka pobacivanja u neobjašnjenim habitualnim pobačajima upozorio je Medawar još 1953. godine. Pretpostavio je da fetus predstavlja imunološki strani graft-presadak koji majka tolerira za vrijeme trudnoća. Vjerovalo se da je fetoplacentno tkivo imunološki strano majci-domaćinu, zbog postojanja naslijeđenih očevih proizvoda i tkivno-specifičnih antigena razlikovanja (tissue-specific differentiation antigens). Prema tome bi, oštećena majčina imunološka tolerancija poluidentičnog zametka mogla bi biti uzrok gubitka trudnoće (22). Iako je u ljudi veoma teško istraživati majčinu i fetalnu imunologiju, mnogi mehanizmi su predloženi u svrhu objašnjenja/razjašnjenja reproduktivnog neuspjeha u ljudi.

Ne postoje specifične imunološki testovi ili kliničke metode koji predviđaju potrebu za liječenjem (23).

Nema zapravo pouzdanih kliničkih ni laboratorijskih kriterija kojima bi se definirali i dokazali imunološki prouzrokovani pobačaji, ako se ne isključe genetski, anatomske, ginekološke, endokrinološke i mikrobiološke vjerojatni uzroci.

EPIDEMIOLOŠKI ČIMBENICI

TRUDNOĆA

Rizik od pobačaja raste s brojem trudnoća, bez obzira kakav je bio ishod prijašnjih trudnoća. To je uočljivo ako su sve prethodne trudnoće završile neuspjehom (24). S brojem prethodno neuspjelih trudnoća povećava se vremenski razmak između trudnoća (25).

ISHOD PRETHODNIH TRUDNOĆA

Rizik od pobačaja varira između 4 i 20% ovisno o tome je li posljednja trudnoća bila uspješna ili neuspješna (12).

MAJČINA DOB

Nezrela dob trudnice te dob majki iznad 35. godine povećani su čimbenik rizika za pobačivanje. Kod trudnica u dobi iznad 35 godina raste broj pobačaja kako kromosomski urednih tako i pobačaja s kromosomskim aberacijama, najčešće s aneuploidijom. Starija životna dob majke i broj prethodnih pobačaja imaju negativno djelovanje na ishod tekuće trudnoće (26).

GENETSKI UZROCI

Kromosomske nenormalnosti važan su populacijski zdravstveni problem. Oko 0,5 do 1% odraslih osoba imaju kromosomsku aberaciju, dok 2 do 4% sve novorođenčadi nosi kromosomsku nenormalnost (27). Najmanje 50% plodova pobačenih u prvom tromjesečju i 20% plodova pobačenih u drugom tromjesečju ima kromosomsku abnormalnost (28). Incidencija balansiranih translokacija u općoj populaciji je 0,2 do 0,4%. Oko 10% parova s dva i više spontanih pobačaja nosi kromosomske promjene. Uglavnom su to translokacije 4 do 5% i mozaicizmi 4 do 5% (29). Singer i suradnici u 417 parova s habitualnim pobačajima balansirane kromosomske aberacije našli su u 4,1%, što je 20 puta češće nego u općoj populaciji (15).

Delecija i inverzija kromosoma nalaze se kod jednog postotka parova s dva i više pobačaja. Pericentrička inverzija prisutna je u oba partnera u 0,1% parova s habitualnim pobačajima. Ako su kromosomske promjene ploda posljedica roditeljske kromosomske inverzije, postoji povećani rizik od pobačaja i anomalije ploda.

Trisomija autosoma najčešća je kromosomska aberacija plodova, a nađena je u oko 50% pobačenih plodova u prvom tromjesečju trudnoće (15). Rizik ponavljanja trisomije uglavnom je povezan sa starijom dobi majke. Sporadične trisomije u dobi majke ispod 35 godina ponavljaju se najviše u jedan posto slučajeva.

Ako žena pobačuje drugi put, vjerojatnost da će kariotip zametka biti opet abnormalan iznosi 80% ako je kariotip prvoga pobačenog zametka bio abnormalan.

Međutim, ako je kariotip prvoga pobačenog zametka bio uredan, vjerojatnost da će ponovo biti uredan u sljedećem pobačaju iznosi 70% (28). Olsen i suradnici u svojoj studiji parova s dva i više spontana pobačaja našli su 10% parova s abnormalnim kariotipom (29).

Genske mutacije mogu biti uzročnicima habitualnom pobačivanju kod plodova koji imaju uredan kariotip (30). Važne su mutacije gena koji kodiraju proizvode bitne za normalan razvoj, mutacije blisko vezanih gena koji kontroliraju skupine gena transkripcijskom regulacijom, mutacije koje dovode do kobnih metaboličkih pogrešaka pa rezultiraju smrću ploda, mutacije letalnog gena vezanog uz glavni sustav tkivne snošljivosti i poremećaji u području protoonkogeni i onkogeni.

ANATOMSKI POREMEĆAJI

Kongenitalne malformacije maternice

Anomalije maternice čine heterogenu skupinu kongenitalnih malformacija koje su posljedica zaustavljenog razvoja, abnormalnog oblikovanja, ili nepotpunog spajanja Müllerovih kanala. Teoretski bilo koji agens može djelovati u razdoblju od 6. do 10. tjedna trudnoće i utjecati na razvoj Müllerovih struktura, bubrežnoga, probavnoga, kardiovaskularnoga te slušnog sustava. Specifičan teratogeni utjecaj nije potvrđen. Opisana je i obiteljska učestalost, no nije potvrđena nasljednost (31). Postoji više klasifikacija anomalija maternice. Najboljom čini se klasifikacija koju je 1988. godine predložilo Američko društvo za probleme neplodnosti:

Klasifikacija anomalija Müllerovih kanala

- I. Hypoplasia/agenesia: **a)** vagine, **b)** cerviksa, **c)** fundusa, **d)** tube, **e)** udružena hypoplasia/agenesia;
- II. Uterus unicornis: **a)** komunicirajući, **b)** nekomunicirajući, **c)** bez materišta, **d)** bez roga;
- III. Didelphus;
- IV. Uterus bicornis: **a)** completus, **b)** partialis;
- V. Uterus septus: **a)** completus, **b)** partialis;
- VI. Uterus arcuatus;
- VII. Anomalije povezane s uzimanje dietilstilbestrola (Diethylstilboestrol DES).

Učestalost anomalija maternice u ženskoj populaciji iznosi oko 1-3% (31,32), prosječna prevalencija u općoj populaciji kao i u populaciji žena fertile dobi iznosi oko 4,3%, u infertilnih žena oko 3,5% dok su kod žena koje habitualno pobačaju, prisutne u oko 13% žena (33) po drugim autorima u 15 do 30% (32). Incidencija habitualnih pobačaja iznosi i do 30% kod žena s anomalijom maternice (34). Postoje brojne kontroverze u pogledu incidencije, klasifikacije anomalija maternice te reproduktivnog neuspjeha udruženih s njima i s time povezanoga najpovoljnijeg liječenja uterušnih anomalija (35). Najčešća anomalija uterusa je uterus septus sa srednjom incidencijom oko 35%, potom

slijede dvoroga maternica oko 25% i uterus arcuatus oko 20% (33). Anomalije maternice uglavnom su asimptomatske. Na njih se može posumnjati tek nakon lošijeg reproduktivnog ishoda u nekih žena, ponavljajućeg pobačaja u prvom tromjesečju, malpozicije plodova, te prijevremenoga pobačaja. Čini se da septum maternice ima najveći utjecaj na ishod trudnoće. Razlog tome je postojanje glatke muskulature u septumu čije kontrakcije mogu dovesti do otežane implantacije ploda u maternici i njegova pobačaja. U prvom tromjesečju trudnoće dolazi do spontanog pobačaja u 21 do 50% žena bez obzira o kojoj se anomaliji uterusa radi (31). Uterus unicornis i uterus didelphus povezani su s većim rizikom pobačivanja nego uterus bicornis i uterus septus (36). Prema nekim studijama metroplastika znatno poboljšava reproduktivnu prognozu. Stopa uspješnosti donesenih trudnoća povećala se na 83% (34,37). Ima opravdanja primjena histeroskopske resekcije septuma uterusa kao terapijskog postupka u pacijentica sa simptomima, ili kao profilaktičkog zahvata u asimptomatskih pacijentica s ciljem poboljšanja njihove šanse za uspješan porod. Histeroskopskom resekcijom septuma u tih pacijentica se postiže stopa ročnih poroda od oko 75% te stopa živorođenih od oko 85% (33). Izgleda da malformacije uterusa, a osobito uterus septus, nisu same po sebi čimbenik infertilnosti (33). Smatra se da se mehanizam pobačaja kod žena s anomalijom maternice temelji na patološkom povišenju intrauterinog tlaka, na asimetričnom širenju maternice, na relativnoj cervikalnoj inkompetenciji, slabijoj prokrvavljenosti zida fuzije i pripadajućeg endometrija te na umanjenoj koncentraciji estrogenskih i progesteronskih receptora.

Anomalije maternice dijagnosticiraju se pregledom u spekulima i bimanualnim pregledom, sondiranjem uterusa, transabdominalnim i transvaginalnim ultrazvučnim pregledom u lutealnoj fazi menstrualnog ciklusa, a u novije doba imaju svoje mjesto trodimenzionalni ultrazvuk, magnetska rezonancija, te laparoskopija, histeroskopija i laparatomija.

INKOMPETENCIJA CERVIKSA

Inkompetencija cerviksa definira se kao prirođena ili stečena nesposobnost vrata maternice da održi intrauterinu trudnoću, a karakteristično je bezbolno nestajanje i otvaranje cerviksa. Može se manifestirati i asimptomatskim prsnućem ovojnice, što prethodi pobačaju, uglavnom u drugom tromjesečju.

Incidencija cervikalne insuficijencije u odnosu na sve trudnoće je 0,05 do 1% (38) ili 2,7 do 18,4 na tisuću živorođenih (39), dok se kod žena koje habitualno pobačaju kao uzrok pobačaja pojavljuje u 12,8% (7).

Inkompetencija cerviksa predstavlja drugi po učestalosti uzrok pobačaja, naročito u drugom tromjesečju.

Insuficijencija vrata maternice dijagnosticira se izvan trudnoće i u samoj trudnoći. Anamneza prethodnih pobačaja, poroda ili ginekoloških operacija od bitne je pomoći. Izvan trudnoće inkompetencija cerviksa dijagnosticira se u drugoj fazi menstrualnog ciklusa ako Hegarov dilatator broj osam ili devet lako prolazi unutarne ušće. Otkriva se zatim cervikohisterografijom i cervikometrijom te transvaginalnim ultrazvukom. Kod nulipara unutarne ušće ne bi smjelo biti šire od osam do devet milimetara.

U trudnoći se inkompetencija cerviksa dijagnosticira pregledom u spekulima i bimanualnim pregledom te ultrazvukom - transabdominalno i vaginosonografski. Mjere se promjene koje se mogu primijetiti na cerviksu prije nego se pojave prvi klinički simptomi. Mjeri se dužina cervikalnog kanala, širina unutarnjeg ušća i debljina prednjeg zida donjega uterinog segmenta (40,41).

INTRAUTERINE ADHEZIJE (ASCHERMANOV SINDROM)

Sindrom je prouzrokovan parcijalnom ili totalnom obliteracijom kavuma maternice a nastaje kao posljedica grube kiretaže nakon poroda ili pobačaja. Ako se ošteti ili ukloni bazalni sloj endometrija i time onemogućiti njegova regeneracija, nastaju endouterine sinehije s obliteracijom materišta uz normalnu funkciju uterusa. Taj sindrom može biti prouzrokovan i upalom endometrija, primjerice tuberkulozom. Dijagnoza se, uz kliničke simptome, postavlja histerometrijom, histerosalpingografijom i histeroskopijom. Može biti uzrokom habitualnom pobacivanju i sterilitetu.

FIBROMIOMI

Učestalost mioma u ženskoj populaciji iznosi od 0,5 do 5%, s time da je prevalencija viša s uznapredovalom dobi žene. Fibromiomi u trudnoći jesu rijetki, a uloga tih benignih tumora kao uzročnika habitualnog pobacivanja upitna je. Kao uzročnici pobačaja u prvome i drugom tromjesečju spominju se submukozni miomi koji remete implantaciju i intramuralni miomi koji se izbočuju prema šupljini maternice te deformiraju i smanjuju kapacitet materišta. Prema tome njihov utjecaj na trudnoću ovisi o njihovoj veličini i smještaju. Miomi mogu rasti i degenerirati u vrijeme trudnoće prouzrokujući bol i aktivnost uterusa. To se obično događa oko 20. do 22. tjedna gestacije. Miomi remete opskrbu maternice krvlju i tako pridonose spontanom pobacivanju, češće nekrotiziraju u puerperiju.

ENDOKRINOLOŠKI UZROCI

INSUFICIJENCIJA ŽUTOG TIJELA

Insuficijencija žutog tijela (IŽT) je poremećaj ovulacijskog ciklusa karakteriziran nedostatnom sekrecijom progesterona u sekrecijskoj fazi menstrualnog ciklusa, što može biti udruženo s habitualnim pobacivanjem (42). Ona prouzrokuje nepotpunu sekretornu transformaciju endometrija što ne osigurava normalnu implataciju i razvitak oplođenog jajašca. U većini slučajeva vjerojatnije je da je pad progesterona sekundarna posljedica neuspjele trudnoće iz drugih razloga.

Novija istraživanja pretpostavljaju da i drugi medijatori kao epidermalni faktor rasta (EGF-epidermal growth factor), insulin like growth factor (IGF) i njegov vezni protein (IGFBPs- insulin like growth factor binding protein) i drugi endometrijski peptidi mogu igrati integralnu ulogu u rastu i diferencijaciji sekrecijskog endometrija (43).

Žuto tijelo čini kontinuum u razvoju folikla pa svi činitelji uključeni u rast i maturaciju folikla u prvoj ciklusnoj fazi utječu na razvoj i funkciju žutog tijela u drugoj ciklusnoj fazi. Smanjena produkcija progesterona kod IŽT prouzrokuje abnormalnost u strukturi, morfologiji i decidualnoj pretvorbi endometrija. Posljedica su smetnje u nidaciji i prvoj tzv. histiotropnoj fazi razvoja oplodjenog jajašca.

Incidencija IŽT varira od 20 do 60%, ali ne postoji pouzdani način ustanovljavanja IŽT u trudnoći (42). Prevalencija IŽT u žena koje se liječe od steriliteta iznosi od 3 do 20% (43), u onih koje habitualno pobačaju od 5 do 60% (43), dok se u fertilnih žena nalazi u 6 do 10% (43). Stray Pedersen iznosi učestalost IŽT od samo 3,1% u parova koji habitualno pobačaju (7). Singer i suradnici iznose prisutnost od 22% IŽT samoga i uz druge poremećaje, koji uvjetuju neadekvatni endometriji kao uzroke spontanij pobačaja (15).

Biopsija endometrija i njegovo histološko datiranje bila je i ostala glavni oslonac u dijagnosticiranju IŽT. Uzorak treba uzeti s prednjega ili stražnjeg zida maternice visoko u fundusu. Dijagnoza IŽT zahtijeva uzimanje uzorka endometrija lutealne faze kroz dva uzastopna ciklusa i da uzorak histološki zaostaje više od dva dana za danom ciklusa. Prema mišljenju nekih autora uzorak za interpretaciju najbolji je ako se uzima jedan do dva dana prije očekivane menstruacije (43). Najčešći kriteriji za IŽT jesu trajanje druge faze ciklusa manje od 10 dana, što se određuje mjerenjem bazalne temperature i/ili razina progesterona manje od 15 nmol/lit. u pet uzastopnih ciklusa. Mjerenje bazalne temperature može se upotrijebiti u dijagnosticiranju IŽT. Međutim, treba naglasiti da monofazni ciklus nije uvijek i anovulatorni ciklus. Zapravo u 75% monofaznih ciklusa moguće je hormonski dokazati ovulaciju (43).

Uzimanje i određivanje serumskog progesterona u sredini lutealne faze te njegova vrijednost veća od tri ng/ml indikativno je za ovulaciju, ali nije dovoljno specifično za pouzdanu dijagnozu IŽT.

Procjena funkcije žutog tijela u neoplođenim ciklusima ne može se primijeniti na trudnice, jer žuto tijelo u trudnoći prema definiciji različito je od žutog tijela izvan nje.

Mjerenje bazalne temperature ne odražava adekvatno lutealnu fazu ciklusa. Izlučivanje progesterona na mahove čini određivanje njegove razine u serumu i na osnovi toga donošenje zaključaka o IŽT nepouzdanim. Biopsija endometrija invazivna je metoda podložna pogreškama pri uzimanju uzoraka kao i pri interpretaciji nalaza (44).

Do sada nije nađena povezanost funkcije steroidnih receptora endometrija i dijagnoze IŽT (43). Dijagnoza IŽT upotpunjuje se ultrazvučnim praćenjem rasta i razvoja folikula, praćenjem debljine i ehogenosti endometrija te praćenjem razvoja žutog tijela. U novije vrijeme i magnetska rezonancija upotrebljava se u procjeni anatomije endometrija (43). Odnedavno se dijagnoza IŽT pokušava upotpuniti određivanjem proteina endometrija u sekrecijskoj fazi ciklusa, kao što su placentni protein 14, progestinski endometrijski protein i endometrijski prolaktin, te integrina (43).

Liječenje IŽT obuhvaća korekciju zbivanja u prvoj fazi ciklusa te podršku žutog tijela s humanim korionskim gonadotropinom (HCG) i progesteronom.

HIPERSEKRECIJA LUTEINIZIRAJUĆEG HORMONA (LH)

Hipersekrecija LH u predovulacijskom razdoblju često je, ali ne i nužno, udruženo sa sindromom policističnih ovarija te može imati za posljedicu sterilitet i habitualne pobačaje (45,46). Smatra se da bi uzrok pobačaja mogao biti neodgovarajuće sazrijevanje jajne stanice zbog patološki povišenog LH. U dijagnostičkom postupku potrebno je serijsko određivanje LH u krvi u prvoj fazi ciklusa. Ako je LH u sredini lutealne faze povišen (10 IU/l ili više), a ultrazvučno se nađu policistični jajnici, tada nas to upozorava na postojanje hipersekrecije LH. Novije studije pokazuju da supresija sekrecije endogenog LH, pomoću GnRh analoga u žena s PCO nije imala utjecaja na ishod trudnoće (47). Ako je testiranje pozitivno, treba ga ponoviti u sljedećem ciklusu i tada ponovni nalaz hipersekrecije zahtijeva liječenje s gonatropin-rilizing-hormonskim analogima (GNRH analozi), ili elektrodijatermijom jajnika (46).

DIABETES MELLITUS

Žene s nereguliranim dijabetesom, s povišenom razinom glukoze u krvi i povišenom razinom glikoliziranog hemoglobina u prvom tromjesečju trudnoće, imaju znatno veći rizik od pobačaja, dok žene s dobro reguliranim dijabetesom nemaju taj rizik (48).

Incidencija subkliničkog dijabetesa nije viša u populaciji žena koje habitualno pobačaju u odnosu na opću populaciju. Istraživanja pokazuju da je učestalost spontanih pobačaja u reguliranih dijabetičarki ista kao i u općoj populaciji (49). Tako dobra prekonceptijska regulacija i regulacija metabolizma u ranoj trudnoći snizuje broj pobačaja.

SUBKLINIČKA DISFUNKCIJA ŠTITNE ŽLIJEZDE

Ne postoje dokazi da subklinička disfunkcija štitne žlijezde doprinosi habitualnom pobačivanju.

METABOLIČKI POREMEĆAJI

Trombofilia

Glavnina uzroka tromboza u trudnoći je posljedica nasljedne sklonost zgrušavanju. Najčešći nasljedni poremećaji su deficijencija antitrombina III, proteina C, proteina S, mutacija Leidenovog faktora V te stoga otpornost na aktivirani protein C, mutacija gena protrombina (G20210A), termolabilna mutacija metilen-tetrahydrofolat reduktaze C677T (50). Autosomalno dominantno naslijeđena deficijencija antitrombina III, proteina C, i proteina S razlog su 10 do 15% obiteljskih tromboza. Mutacija protrombin gena i Leidenovog faktora V najčešći su nasljedni uzročnici venskih tromboza. Heterozigotni nosioci mutacije faktora V imaju 8 puta veći rizik za vensku trombozu dok homozigoti imaju 80 puta povećan rizik za vensku trombozu, a on se dalje

pojačava upotrebom oralnih kontraceptiva. Učestalost ove mutacije najveća je u Euvropljana, iznosi od 3-4% (23) do 5-9% (50), dok je rijetka u populacijama Azijata i Afrikanaca. Aktivirani protein C inhibira koagulaciju razgrađujući faktor V i VII. Jedno od tri mjesta cijepanja faktora V je točno mjesto mutacije koje zamjenjuje glutamin s argininom (adenin za arginin na nukleotidu 1691 u genu). Ova mutacija čini faktor V otpornim na degradaciju (i aktivaciju fibrinolize). Potpuni kaskadni niz zgrušavanja je onda otporan na djelovanje sustava proteina C. Podaci iz kontrolnih studija ukazuju da habitualni pobačaji prvog tromjesečja nisu udruženi s mutacijom Leidenovog faktora V, iako je moguća povezanost s pobačajima drugog tromjesečja. Moguće objašnjenje je da su prvi odraz neuspjele implantacije, a drugi posljedica trombotičnih događanja u posteljici (50). Hiperhomocisteinemia može biti posljedica poremećaja nekog od enzima uključenih u metabolički put metionina (50). Normalna koncentracija homocisteina u plazmi je 5-15 mol/L, određuje se plinskom kromatografijom ili drugim osjetljivim biokemijskim metodama, te testom opterećenja metioninom. Hiperhomocisteinemija se klasificira u tri kategorije prema razini homocisteina u serumu na tašte:

1. Jaka homocisteinemija (>100mol/L),
2. Srednja (25-100 mol/L),
3. Blaga (16-24 mol/L),

Smanjenje ili nedotatak u ishrani folata, vitamina B12 i vitamina B6 može biti uzrokom srednje do blage homocisteinemije. Jaka homocisteinemija, nasljedna autosomalno recesivna homozigotna deficijencija enzima ili cistationin B-sintaze ili metilen-tetrahidrofolat reduktaze, metabolički je poremećaj udružen s neurološkim poremećajima, prijevremenom aterosklerozom i ponavljanim tromboembolijama te visokom stopom fetalnog gubitka (51). Blaga do srednja hiperhomocisteinemija može biti ili zbog autosomalno dominantne heterozigotne deficijencije cistationin B-sintetaze (0,3-1,4%) ili od homozigotne mutacije C677T termolabilne metilen-tetrahidrofolat reduktaze, prisutna je u 11% bijelih Europljana (50). Intolerancija metionina nađena je u 21 od 100 žena s iskustvom habitualnog pobacivanja (51). Povišena razina homocisteina je faktor rizika za vensku trombozu, abrupciju posteljice, habitualno pobacivanje, preeklamsiju (23,50).

Pitanje je kada i koga testirati na trombofiliju?

Nema dokaza koji podržavaju rutinski probir svih trudnih žena na trombofiliju. Studije krvi zdravih dobrovoljnih davalaca pokazale su čestu učestalost trombofiličkih gena, većina muškaraca i žena s deficijencijama proteina S, proteina C i antitrombina III su bez simptoma.

Žene s komplikacijama trudnoće i habitualne pobacilje, bez anamneze tromboembolije ne treba testirati na trombofiliju osim testiranja za antifosfolipidni sindrom.

Testirati treba samo žene koje u anamnezi imaju duboku vensku trombozu ili pozitivnu obiteljsku anamnezu za tromboemboliju. U obiteljima s nasljednom trombofilijom testove probira preporuča se učiniti prije puberteta (50).

Wilsonova bolest

To je autosomalno recesivna nasljedna bolest. Visoka stopa pobačaja kod Wilsonove bolesti posljedica je visoke koncentracije bakra, zbog nasljednog poremećaja gena na kromosomu 13, što uzrokuje poremećaj u transportu bakra te njegovo nakupljanje u jetri i u drugim ekstrahepatalnim tkivima (rožnici, mozgu, bubrezima, skeletu, srčanom mišiću). Bolest je iznimno rijetka te ne doprinosi značajno etiologiji habitualnih pobačaja (52).

OKOLIŠNI UČINCI

Pušenje i alkohol

Razmjerno visoka učestalost izloženosti alkoholu i pušenju u modernom društvu znači da, unatoč malome nepovoljnom učinku na ishod pojedine trudnoće, oni mogu imati značajnu ulogu u ponavljajućim pobačajima. Rizik se povećava proporcionalno s brojem popušanih cigareta, u nekim novijim studijama nije nađena povezanost uzimanja kofeina i ponavljanih pobačaja (23).

Videoterminalne jedinice

Nije potvrđeno do danas da su žene koje rade na terminalima izložene većem riziku od pobačavanja (53,54,55).

Tvari iz okoline

Niska razina izloženosti anestetičkim plinovima, formaldehidu, olovu i etilen oksidu povezuju se sa spontanim pobačajima (56). Isotretinoin (Accutane) je definitivno udružen s povećanom incidencijom spontanih pobačaja kao i korištenje električnih prekrivača i vodenih kreveta s toplom vodom (23)

Psihološki uzroci

Ne postoji siguran dokaz da psihološki stres znatnije doprinosi češćem habitualnom pobačavanju, iako je psihoterapija pokazala dobre rezultate u liječenju habitualnih pobačaja kojima se nije uspjelo objasniti uzrok (7,26).

MIKROBIOLOŠKI UZROCI

Sama prisutnost mikrobiološkog uzročnika u ginekološkom traktu žene u vrijeme pobačaja ne može biti dokaz da ga je to i prouzrokovalo. Da bi neki mikroorganizam prouzrokovao habitualni pobačaj, morao bi biti prisutan dulje vrijeme u ginekološkom traktu žene bez stvaranja značajnih simptoma majci. Na taj način propusti se dijagnosticirati uzročnik i provesti liječenje. Kao drugo, morao bi stvarni mikrobiološki uzročnik dobiti pristup u intrauterinu okolinu, prouzrokovati endometritis ili upalu fetalnih tkiva i time izazvati upalnu reakciju odgovornu za spontani pobačaj.

Iako je nađena udruženost sporadičnih pobačaja s Ureaplasmom urealyticum, Mycoplasmom hominis, Chlamydiom trachomatis i Toxoplasmom gondii, ne

postoje uvijek mogući uvjerljivi dokazi za njihovu udruženost s habitualnim pobacivanjem (57)

IMUNOLOŠKI UZROCI

Nemogućnost zanošenja ili iznošenja trudnoće do termina može biti posljedica poremećene ekspresije imunoloških čimbenika tijekom trudnoće. Iako relativna važnost imunoloških čimbenika u ljudskoj reprodukciji ostaje sporna, pretpostavka je da HLA (Human leucocyte antigen), protuspermijska protutijela, integrini, inhibicijski čimbenik leukemije (LIF), citokini, antifosfolipidna protutijela, čimbenici endometrijske adhezije, mucini (MUC1) i uterine NK stanice doprinose reprodukcijском neuspjehu. Dok manje podataka podržava uloge antitrofoblastnih protutijela, antiendometrijskih protutijela, T stanica, perifernih NK stanica i antiHLA protutijela, blokirajućih protutijela i supresijskih stanica (14).

AUTOIMUNI UZROCI

Antifosfolipidna protutijela (APA) mogu utjecati na trudnoću od faze blastociste/trofoblasta do poroda.

APA su skupina heterogenih protutijela s različitim specifičnostima (58), cirkuliraju u perifernoj krvi i peritonealnoj tekućini (59) i vežu fosfolipide membrane trombocita i drugih serumskih faktora, kao što su Faktor III, protrombin, Faktor Xa i Faktor V i kalcijum (60).

Antifosfolipidna protutijela štetno utječu na razvoj posteljice, sekreciju hormona, razvoj endotela i trofoblasta (61).

Njihove brojne uloge vjerojatno odražavaju njihovu široku rasprostranjenost (62).

Kvantitativna koncentracija antifosfolipidnih protutijela (APA) i različite klase APA mogu utjecati na reprodukcijски ishod. Važnost drugih antifosfolipidnih protutijela osim antikardiolipinskih protutijela (ACA) i lupus antikoagulansa (LA) ostaje kontroverzna.

Lupus antikoagulans (LA) i antikardiolipinska protutijela (ACA) jesu cirkulirajuća antifosfolipidna protutijela IgG i IgM i/ili IgA klase, ili monoklonska protutijela koja su usko povezana s fetalnim gubitkom, venskom i arterijskom trombozom i trombocitopenijom, hemolitičkom anemijom (63,64,65).

U grupu antifosfolipidnih protutijela uz LA i ACA spadaju i antifosfatidilserin, fosfatidilinozitol, fosfatidilglicerol protutijela, fosfatidiletanolamin.

Prije se vjerovalo da antifosfolipidna protutijela vežu samo njihove izravne antigene. Međutim, bjelančevine koje vežu fosfolipide (phospholipid-binding proteins) kao anexin V, protein C i protein S i β 2-glikoprotein I (β 2-GPI) također su uključene u stvaranje i vezanje protutijela na negativno nabijene fosfolipide u bolesnika s antifosfolipidnim sindromom (64).

Antikardiolipinska protutijela dijele se u dvije podvrste:

- a) β 2 glikoprotein I ovisna

b) β 2-glikoprotein I neovisna protutijela (50).

Antifosfolipidna protutijela in vitro vežu se za negativno nabijene fosfolipide i tako produljuju koagulaciju ovisnu o fosfolipidima. Bolesnice koje imaju povišenu razinu antifosfolipidnih protutijela imaju povećanu sklonost krvarenju, ali često razvijaju tromboembolijsku bolest (64). Injekcija pročišćenih antifosfolipidnih protutijela trudnoj mišici uzrokuje fetalnu smrt s hemoragično/ishemičnom nekrozom fetoplacentne jedinice. Postavlja se pitanje reproducibilnosti i potrebne količine protutijela koja to uzrokuju. Antifosfolipidna protutijela osobito antifosfatidil serin, su jedina poznata protutijela koja mogu interferirati s funkcijom trofoblasta. Sprečavaju fuziju citotrofoblasta i stvaranje sinciotrofoblasta, te potiču zgrušavanje arterijske krvi. Evidentno je međutim da i druga protutijela uključujući i autoprotutijela imaju potencijal da interferiraju s razvojem i funkcijom trofoblasta (66). Budući da se proces fuzija trofoblasta nastavlja tijekom cijele trudnoće prema sincicijskom dijelu posteljice, stanice trofoblasta su možda jedine stanice koje ekspimiraju fosfatidilserin na svojoj površini tijekom dužeg razdoblja (64). Zašto netko razvija antifosfolipidna protutijela ne zna se, ali povezanost između alela HLA II.razreda i drugih protutijela čini vjerojatnim da aleli II. razreda također predisponiraju stvaranje antifosfolipidnih protutijela.

Iako ne postoji potpuna suglasnost, glavna dokaza upućuje je da su HLA-DR4, DR7 i DQ7 rizični faktori za razvoj antifosfolipidnih protutijela (64).

Pod antifosfolipidnim sindromom podrazumijevamo udruženost LA i jednoga ili dvaju kliničkih kriterija.

To su: prvo, venska ili arterijska tromboza, drugo, habitualni pobačaj, fetalna smrt ili rana neonatalna smrt i, treće, autoimuna trombocitopenija, ili udruženost kliničkih kriterija sa srednje do visoko pozitivnim IgG ACA, ili LA i srednje do visoko pozitivan IgG ACA (67) i LA i srednje do visoko pozitivni IgM ACA.

Primarni antifosfolipidni sindrom je izoliran, a sekundarni antifosfolipidni sindrom pojavljuje se udružen s drugim bolestima, kao što je sistemski lupus eritematodes (50).

Antifosfolipidni sindrom povezan je s većom učestalošću prijevremenog poroda, nevolja ploda (fetalnog distresa), preeklampsije i zastojem rasta ploda (67) i abrupcije posteljice (50).

Kvantitativna koncentracija antifosfolipidnih protutijela također utječe na kasniji reproduktivni neuspjeh.

Lockshin i suradnici našli su da žene s >40 jedinica antifosfolipidnih protutijela IgG češće imaju veće fetalne gubitke (fetal losses) nego žene s <40 jedinica. Stopa fetalne smrti također raste s povećanjem koncentracije antifosfolipidnih IgG protutijela (68).

Antifosfolipidni sindrom najčešći je uzrok stečene trombofilije (50).

Različite klase imunoglobulina antifosfolipidnih protutijela djeluju različito na reproduksijski ishod. Žene s IgM antikardiolipinskim protutijelima, ili niskom koncentracijom IgG antikardiolipinskim protutijelima, imaju značajno niži rizik

za reproduktivni neuspjeh nego žene s LA, ili srednje do visokom koncentracijom antikardiolipinskih IgG protutijela (69).

Važno je naglasiti da sama prisutnost antifosfolipidnih protutijela nije nužno uzrok autoimunih bolesti udruženih s APA (69).

Manje od 2% trudnica ima pozitivan IgG ACA, a 4% IgM ACA, a njih 80% imaju nisku razinu protutijela (70). Samo dvije trudnice od 737 slučajno odabranih trudnica imaju pozitivan LA, što iznosi 0,3% (71).

Ti podaci pokazuju da je u općoj populaciji neopravdano određivati antifosfolipidna protutijela kao testove probira za traženje uzroka neuspjelih trudnoća i komplikacija trudnoća.

Iako APA mogu štetno djelovati na reproduktivni neuspjeh tijekom prvog, drugog ili trećeg tromjesečja, ne postoji slaganje u kojem vremenskom periodu antifosfolipidna protutijela najčešće djeluju nepovoljno na ishod trudnoće.

Tijekom prvog tromjesečja u 2-16% trudnica habitualnih pobacilja nađena su antifosfolipidna protutijela (72,73,74,75,76,77).

Simpson i suradnici ne nalaze povezanost između antifosfolipidnih protutijela/antikardiolipinskih protutijela i pobacivanja u prvom tromjesečju tj. antifosfolipidna protutijela ne povećavaju rizik pobacivanja u prvom tromjesečju (78).

Meta analizom sakupljenih podataka iz sedam prospektivnih i retrospektivnih istraživanja o povezanosti antifosfolipidnih protutijela i *in vitro* oplodnje Hornstein i suradnici nisu našli značajniju povezanost ni između antifosfolipidnih abnormalnosti i kliničkih trudnoća niti s brojem živorođenih u bolesnica uključenih u IVF postupke (79).

S ciljem da otkrije koja vrsta ponavljano gubitka trudnoće je povezana s antifosfolipidnim protutijelima Oshiro i suradnici retrospektivno su analizirali žene s dvije i više neuspjele trudnoća. Gubitak trudnoće bio je isti u žena sa i bez antifosfolipidnih protutijela, s time što je smrt ploda činila 50% gubitaka trudnoće u žena s pozitivnim antifosfolipidnim protutijelima u odnosu na manje od 15% u žena s negativnim nalazom antifosfolipidnih protutijela. Više od 80% žena s antifosfolipidnim protutijelima imalo je najmanje jednu fetalnu smrt u usporedbi s manje od 25% kod žena bez antifosfolipidnih protutijela. I autor zaključuje da je u žena s ponavljanim gubitcima trudnoće i pozitivnim antifosfolipidnim protutijelima fetalna smrt karakterističniji oblik gubitka trudnoće, prije nego pobačaj u prvom tromjesečju (80).

Učestalost LA kod ispitanica s dva i više spontana pobačaja iznosi od 5 do 14%, a učestalost ACA od 7 do 11%, dok se učestalost antifosfolipidnih protutijela kod tih ispitanica kreće od 10 do 16% (72,73,74,75,76). Antifosfolipidna protutijela nađena su u 1/3 pacijentica koje su imale ponavljajući gubitak trudnoće (64).

Vjeruje se da je glavni razlog fetalnog gubitka tromboza spiralnih arterija posteljice.

Antifosfolipidna protutijela interferiraju s proteinima koji sadrže fosfolipide ili s kompleksima koji uključuju β 2-glikoprotein, protein C, fosfolipazu A2, protrombin, trombomodulin i anexin V.

Vjerojatno vezanjem LA na membrane endotelnih stanica, dolazi do inhibicije stvaranja prostaciklina, a to dovodi do poremećaja odnosa između tromboksana A₂ i prostaciklina.

Postoje i dokazi o smanjenoj trombomodulin ovisnoj aktivaciji proteina C i inhibiciji fibrinolize. Placenta je bogata trombomodulinom i ima važnu ulogu u produkciji prostaciklina (PG I₂), čime se može objasniti zašto je posteljica zahvaćena trombotičkim procesima (6).

Inhibitorna djelovanja antifosfolipidnih protutijela na intercelularnu fuziju stanica trofoblata, na produkciju hormona i na invaziju trofoblata pretpostavlja se da su uzrok brojnih komplikacija viđenih u antitrofoblastnom sindromu, zato što antifosfolipidna protutijela induciraju disfunkciju trofoblata.

Stvaranje sincicijuma i diferencijacija hormona odvojeni su ali paralelni događaji. Za uspješnu trudnoću neophodna je također odgovarajuća produkcija hormona trofoblata. U primarnoj kulturi trofoblata, monoklonska protutijela u reakciji s fosfolipidnim antigenima snižavaju približno 40% sekreciju HCG i HPL u odnosu na kontrolni nivo. Proces kojim se to odvija nije još jasan. Produkcija hormona izgleda odgovara na prijenos signala preko membranski vezane fosfolipaze C i protein kinaze C; serumi s antifosfolipidnim protutijelima mogu blokirati indukciju stvaranja HCG s egzogenom fosfolipazom C, ovisnoj o fosfolipidima membrane, ili s gonadotropin releasing hormonima. Moguće je da antifosfolipidna protutijela mogu interferirati s transdukcijom signala u stanicama trofoblata i spriječiti indukciju proizvodnje posteljičnih hormona (64).

Anexin V nađen je na apikalnoj površini sinciciotrofoblata posteljice, koncentracije ovog proteina značajno su smanjene na resicama posteljice pacijentica s antifosfolipidnim sindromom. Nedavno je pokazano da su pojedine frakcije IgG seruma žena s antifosfolipidnim sindromom pomicala anexin V s površine trofoblata i endotelnih stanica *in vitro* i tako bile sklone prokoagulantnom stanju.

To potvrdije koncept da anexin V ima antitrombotičko djelovanje na površini trofoblata i u krvožilju.

Snižena razina produkcije IL3 pokazana je u ljudi s antifosfolipidnim sindromom i eksperimentalno u miševa. Kao što IL3 igra aktivnu ulogu u modulaciji posteljičnog rasta, shvatljivo je da njegovo snižavanje u antifosfolipidnom sindromu može objasniti kliničku sliku sindroma fetalnog gubitka.

Mnogobrojne metode koriste se za otkrivanje antifosfolipidnih protutijela, Međutim, jedini test koji je trenutno standardiziran je test za antikardiolipiska protutijela.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) uključuje izravno vezanje protutijela za kardiolipin (81) ili fosfolipidima prekrivene staklene kuglice (82). Serumski standardi za druga antifosfolipidna protutijela nisu na raspolaganju (22). Nasuprot tome, ne postoje općenito prihvaćeni kriteriji za otkrivanje lupus antikoagulansa (83), iako je na raspolaganju nekoliko testova probira.

Za otkrivanje LA u plazmi rabe se testovi zgrušavanja ovisni o fosfolipidu: aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV), vrijeme zgrušavanja ovisno o kaolinu i dilute Russel viper venom time.

U prisutnosti LA oni su produženi. Da bi se isključili drugi uzroci produljenju, ispitivanoj plazmi dodaje se jednaka količina plazme zdrave osobe. Ako se APTV normalizira, valja posumnjati na nedostatak faktora zgrušavanja. Ako normalizacija izostane i postigne se dodatkom fosfolipida, onda to upozorava na prisustvo LA.

ACA otkrivaju se enzimskim i radioimunološkim testovima. Rezultati se izražavaju u GPL (IgG ACA) ili u MPL (IgM ACA) jedinicama. Interpretiraju se kao *negativni, slabo pozitivni, srednje pozitivni i visoko pozitivni*. Testovi se provode prema uputstvima proizvođača. Nisko pozitivni IgM ACA uz negativne LA i negativne IgG ACA nemaju veće kliničko značenje.

Značajka antifosfolipid pozitivnih žena je da imaju dva pozitivna testa, dok nisu trudne, u razmaku od najmanje 6 tjedana (65).

U otkrivanju antifosfolipidnih protutijela postoje velike međulaboratorijske varijacije, što se može objasniti primjenom različitih testova, te prirodnom fluktuacijom protutijela u osoba (50). Uz to, relativna važnost i vremensko razdoblje tijekom kojeg antifosfolipidna protutijela djeluju na reproduksijski ishod u ljudi i dalje je kontroverzna. Nesretno je, što nema slaganja koja se kvantitativna koncentracija antifosfolipidnih protutijela smatra patološkom. Nepostojanje standardiziranih testova, prije nego metodologija, može utjecati na interpretaciju pokusa (84).

Liječenje trudnica s povišenim antifosfolipidnim protutijelima i antifosfolipidnim sindromom provodi se malim dozama aspirina, niskim dozama heparina i pronisona, pojedinačno ili u kombinaciji. Slučajevi koji ne odgovaraju na spomenutu terapiju liječe se imunoglobulinima i plazmaferezom.

Niske doze aspirina mogle bi poboljšati ishod trudnoće u žena s antifosfolipidnim protutijelima ireverzibilnom blokadom djelovanja ciklooksigenaze trombocita, time inhibirati sintezu trombocitnog tromboksana i prevenirati trombozu krvnih žila posteljice.

Heparin vjerojatno štiti fosfolipide trofoblasta od napada antifosfolipidnih protutijela potičući uspješnu implantaciju rane trudnoće, dodatno svojim antikoagulantnim djelovanjem.

Buduće studije trebale bi odrediti dobrobit prijekoncepcijske primjene heparina i utvrditi može li se obustaviti liječenje u 13. tjednu trudnoće bez lošeg utjecaja na stopu živorođenih (64).

Kod neliječenih žena s pozitivnim ACA stopa uspješnosti trudnoća je 10 do 15% (85), dok se kod liječenih stopa uspješnosti penje na 70% (86).

Fetalni gubitak obično se događa u drugom tromjesečju kod žena s pozitivnim antifosfolipidnim protutijelima.

Različitosti između studija o udruženosti APA i reproduktivnog neuspjeha, proizlaze iz različitih etioloških kriterija te definicija reproduksijskog neuspjeha

istraživanih skupina kao i razlika u definiranju pozitivnih titrova antifosfolipidnih protutijela (87).

Osim toga, tijekom trudnoće mijenjaju se u serumu koncentracije antifosfolipidnih protutijela kod jedne osobe. Pretpostavlja se da vrijeme kada se izvodi test na antifosfolipidna protutijela može uvelike utjecati na rezultate (88). Na primjer, prolazno negativni rezultati antifosfolipidnih protutijela nađeni su u nekih žena s klinički definiranim APS tijekom drugog tromjesečja i krajem trećeg tromjesečja trudnoće (88).

Povećana učestalost habitualnih pobačaja i fetalne smrti nađena je kod pacijentica sa sistemskim lupus eritematosusom, progresivnom sistemskom sklerodermijom, polimiositis-dermatomiositisom i mješovitim bolestima vezivnog tkiva (6). Mnoge bolesnice koje nemaju kliničke znakove sistemskog lupusa eritematosusa imaju pozitivna autoprotutijela.

Najbolji test probira za autoimune bolesti jest titar antinuklearnih protutijela. Titar veći od 1:80 obično je dokaz autoimune bolesti. Taj test nije specifičan za sistemski lupus eritematosus (SLE), te se za postavljanje dijagnoze SLE treba određivati i LE stanice, anti DNA protutijela, antiSSA (Ro), antiSSB (La). AntiSSA(Ro) protutijela prouzrokuju prirođeni srčani blok. Fetalna smrt u drugom tromjesečju kod trudnica sa SLE udružena je s prisutnošću antifosfolipidnih protutijela u serumu tih trudnica (86).

Trudnice s antinuklearnim protutijelima pobačaju obično u prvome ili drugom tromjesečju.

Nađena je također povišena incidencija habitualnih pobačaja u pacijentica s povišenom razinom protuspermijskih protutijela (89), te kod onih s povišenom razinom protutijela protiv zone pelucide (89).

Protuspermijska protutijela (ASA) pretežito utječu na razvoj gameta, fertilizaciju i dijeljenje embrija.

Protuspermijska protutijela u muškaraca oštećuju maturaciju spermija, štetno djeluju na njihovu funkciju i na cjelokupnu kvalitetu sjemena (90).

U žena, protuspermijska protutijela djeluju na potskoitalno preživljenje spermija u reproduktivskom traktu (91), prepoznavanje i fuziju spermija-oocite (92) te na rano dijeljenje embrija (93).

Naz je pretpostavio da specifični spermijski antigeni određuju signal za dijeljenje oocite (93).

Istraživanja pokazuju da ASA ne utječu na reproduktivski ishod u parova podvrgnutih IVF. Postoji kritička potreba, za standardizacijom izvođenja testova, titrova protutijela i interpretacijom testova za protuspermijska protutijela. Na nesreću, ne postoji superiorni test za detekciju ni antigena niti protutijela (94,95,96) i točna procjena prevalencije protuspermijskih protutijela razlikuje se, ovisno o testovima kojima su određivana, zbog razlike u pripremi uzoraka, senzitivnosti, pouzdanosti, tehničke kompleksnosti i interpretacije testova.

U muškaraca, protuspermijska protutijela posljedica su ili sistemskih ili lokalnih imunoloških reakcija. Protuspermijska protutijela nađena su u sjemenu, sjemenoj plazmi, serumu ili se vežu za vanjsku membranu spermija (sperm plasma membrana) (97).

U žena, protuspermijska protutijela nađena su u krvi, folikularnoj tekućini ovarija, vaginalnom ili cervikalnom sekretu (97). U muškaraca, kod prekida barijere krv testis, antigeni spermija potaknu imunološku reakciju, te je moguće stvaranje protuspermijskih protutijela prije fertilizacije. Stvaranje protuspermijskih protutijela može rezultirati oštećenjem (damage), inflamacijom, ili mehaničkom obstrukcijom genitalnog trakta (98).

Mikroorganizmi koji uzrokuju spolno prenosive bolesti mogu također uzrokovati stvaranje protuspermijskih protutijela, i to vezanjem za spermatozoe te taj kompleks djeluje kao strani antigen. Iako su brojne studije istraživale učinke protuspermijskih protutijela u oba spola, ostaju upitni točni mehanizmi kojima protuspermijska protutijela štetno djeluju na fertilitet i reprodukciju. Nedavno, istraživači nisu našli udruženost između protuspermijskih protutijela i RSA (99,100).

Spontani pobačaji također su značajka II tipa autoimune reakcije protiv nekih eritrocitnih antigena. Bračni parovi kod kojih majka ima krvnu grupu 0, a otac krvnu grupu A imaju manji broj djece krvne grupe A, nego što bi se očekivalo (89). Žene s genotipom pp imaju u cirkulaciji prisutna protutijela protiv P antigena krvne grupe, koji može biti odgovoran za neke slučajeve pobačivanja (89).

POREMEĆAJ MATERNO-FETALNOG AUTOIMUNOG ODNOSA

Postojalo je više hipoteza kojima se pokušalo objasniti imunološki uzrok habitualnom pobačivanju, kod određenog broja neobjašnjenih uzroka habitualnih pobačaja.

Prema **prvoj** hipotezi za uspješnu trudnoću potrebno je blokirati imunološki mehanizam, povezan s antigenima glavnog sustava tkivne snošljivosti, sa specifičnim protutijelima.

Raspoloživi dokazi za spomenuto jesu konflikti i konfuzni (101); primjerice, odsutnost ekspresije klasičnih antigena I. i II. razreda HLA sustava na sinciotrofoblastu, vodećoj populaciji stanica koja je izložena u majčinoj krvi. Uz to za uspješnu trudnoću nisu nužna blokirajuća protutijela (102).

Stanična imunost se može promijeniti kod nekih habitualnih pobačaja.

Prema **drugoj** hipotezi podudarnost partnera u TLX antigenima (trophoblast lymphocyte cross reacting antigen) onemogućuje stvaranje blokirajućih protutijela (103).

Pretpostavka je da je ključ za preživljenje fetusa majčino prepoznavanje TLX antigena i stvaranje antiTLX protutijela. Nesposobnost majke da stvori ta protutijela može dovesti do pobačaja. Imunološka, biokemijska i funkcionalna osnova za tu hipotezu ostaje nerazjašnjena, i u najboljem slučaju njeno sadašnje stanje ostaje nedokazano.

Podudarnost u više HLA antigena, a posebno onih s D/DQ locusa, vjerojatno ide sa podudarnošću u TLX sustavu. Te podudarnosti mogu biti uzrok majčine hiporeaktivnosti na očeve antigene, a time i zatajivanja i stvaranja odgovarajućeg imunoprotektivnog odgovora na fetalnom trofoblastu.

Prema **trećoj** hipotezi povećana podudarnost u HLA locusima, naročito locusa B i DQ, češće nego bi se to očekivalo (104) dovodi do neprepoznavanja fetusa, budući da su podudarni u nekim polimorfnim genima. To dovodi do nestvaranja zaštitnih blokirajućih protutijela, što rezultira pobačajem.

Drugo uporište te hipoteze je genetsko. Povećana podudarnost u HLA locusima između partnera može biti povezana s podudarnošću u recesivnim letalnim genima vezanima uz HLA locus, što u homozigota prouzrokuje pobačaj (105). Kod toga slučaja podudarnost HLA locusa sama po sebi nije bitna.

Postoje oprečni iskazi o podudarnosti HLA haplotipova kod parova koji habitualno pobačaju te povezanosti pobačaja s HLA podudarnošću partnera (106, 107).

Navedene teorije, po kojima do habitualnog pobačivanja dolazi zbog nemogućnosti majke da stvori limfocitotoksička protutijela ili blokirajuća protutijela protiv očevih limfocitnih antigena (HLA) ili antigena čija je ekspresija vezana uz HLA antigene na fetusu ili trofoblastu, općenito su odbačene (108).

Današnje teorije zasnivaju se na nedavnim otkrićima funkcioniranja i međusobnog djelovanja imunološkog sustava uopće i imunološkog sustava napose lokalno na fetomaternalnoj jedinici.

Neke od ovih teorija pretpostavljaju da u habitualnom pobačivanju može imati ulogu povećana citotoksičnost decidualnih NK stanica ili NK stanica periferne krvi na fetalne antigene, dok druge teorije pretpostavljaju da mehanizam sličan autoimunosti igra određenu ulogu.

Mnoge organ specifične autoimunosne bolesti karakterizira tako zvani Th1 citokini odgovor (lučenje interferona- γ , interleukina-2, faktora nekroze tumora- α , i faktora nekroze tumora- β) kao reakcija-odgovor na ciljane antigene (109).

Normalnu trudnoću izgleda karakterizira predominantno Th-2 tip reakcije protiv trofoblastnih antigena (110), dok, naprotiv, habitualne pobačaje karakterizira Th-1 tip odgovora. (111).

U brojnim studijama nađena je povećana prevalencija autoprotutijela (npr. antifosfolipidnih protutijela i antinuklearnih protutijela kod žena koje habitualno pobačaju. Neki autori smatraju da su ova autoprotutijela uzročni faktor u patogenezi habitualnog pobačivanja, dok drugi smatraju da su ona epifenomen koji posredno može predisponirati Th-1 citokini odgovor na fetomaternalnoj jedinici (18).

Sve više postoji dokaza za aloimunološke mehanizme kao uzroke pobačivanja u nekih žena.

Povišena razina NK stanica nađena je u krvi žena koje su habitualno pobačivale kariotipski normalne plodove.

Fenotipski, periferne stanice NK obilježavaju sljedeći markeri CD56^{dim}, CD16^{bright} i CD3⁻.

Periferne NK stanice važne su obrani od virusa, bakterija, malignih stanica i vlastitih stanica zaraženih virusom te su sposobne za citotoksičko ubijanje ciljnih stanica (112).

NK stanice otkrivaju se imunohistološki, protočnom citometrijom, ili morfološki pod elektronskim mikroskopom (113). Samo mjerenje NK citotoksičnosti

protočnom citometrijom je reproducibilno i precizno i može se uspješno koristiti za procjenu uzoraka krvi pacijenata (114).

Ne postoji korelacija između periferne NK citotoksičnosti i postotka ili absolutnog broja NK stanica (114).

Tako, ranije studije evaluiraju NK aktivnost u žena s RSA samo brojenjem NK stanica, te ne mogu točno odrediti NK aktivnost.

Broj snažnih citotoksičnih NK stanica ($CD16^+CD57^-$) značajno se povećava tijekom rane trudnoće i snizi tijekom kasne trudnoće.

Broj umjereno citotoksičnih NK stanica ($CD16^+CD5^+$) također je snižen za vrijeme kasne trudnoće. Nakon poroda, broj $CD16^+CD57^-$ i $CD16^+CD5^+$ vrati se na vrijednosti prije trudnoće.

Broj Slabih citotoksičnih NK stanica ($CD16^-CD56^+$) snizi se 1 do 4 mjeseca nakon poroda (115). Izrazita brojnost snažnih citotoksičnih $CD16^+CD57^-$ stanica tijekom rane trudnoće može rezultirati reproduktivnim neuspjehom, dok je tijekom kasne trudnoće snižen broj snažnih i umjerenih citotoksičnih NK stanica ($CD16^+CD57^-$ i $CD16^+CD5^+$) potreban za održanje fetusa (115).

Nekoliko istraživanja pokušalo je povezati aktivnost perifernih NK stanica s reproduktivnim neuspjehom, budući da neke žene s RSA pokazuju značajno povećanje perifernih NK stanica ($CD56^+$ i $CD56^+/CD16^+$) tijekom trudnoće u usporedbi s kontrolom (116).

Povećana razina NK stanica u netrudnih žena udružena je s povećanjem vjerojatnosti spontanog pobačaja u trudnoćama koje slijede. Žene s iskustvom habitualnih pobačaja i visokom prijekoncepcijskom NK aktivnošću imaju značajno veću stopu pobačaja u trudnoćama koje slijede u usporedbi s onima s normalnom prijekoncepcijskom koncentracijom NK stanica (117). Koncentracija perifernih $CD56^+$ ima senzitivnost od 86% u habitualnih pobačaja da nose kariotipski normalni plod (118).

Nepouzdan je broj perifernih NK stanica za evaluaciju prognoze reprodukcijskog ishoda.

Nalaz visoke koncentracije $CD56^+16^+$ NK stanica u uterusu žena koje pobačaju sugerirao je postojanje vjerojatne citotoksičnu aktivnost na mjestu implantacije.

U normalnih trudnoća, postoji pomak u obrascu aktivacije T stanica prema Th2 putu, čime se blokira interakcija između makrofaga i NK stanica. Aktivacija T stanica putem Th1 niza rezultira produkcijom abortogenih citokina kao što su interelukin-1 i interferon i zamijećeno je u habitualnih pobačaja (25,111)

Uspješna trudnoća rezultat je aloimunizacijom poticanog oslobađanja imunosupresijskih molekula iz prirodnih supresijskih stanica u decidui (25).

HLA (Human Leukocyte Antigene) SUSTAV

Glavni sustav tkivne podudarnosti (GSH) kod čovjeka je HLA sustav. Taj sustav građom i funkcijom vrlo je sličan, ako ne i identičan, istoimenim sustavima kod drugih životinjskih vrsta.

Glavna biološka uloga gena HLA jest imunološko prepoznavanje antigena, primjerice, virusa, bakterija, gljivica, tumorskih antigena te imunološka reakcija protiv tih antigena.

Sustav HLA najsloženiji je genski sustav danas poznat kod čovjeka.

Sastoji se od više vezanih gena koji se nalaze na kratkom kraku kromosoma šest. Taj kromosomski segment, koji sadržava blisko smještene gene, nazvan je glavnim kompleksom - sustavom tkivne snošljivosti - podudarnosti. Ti geni nadziru proizvodnju makromolekula koje su sastavni dijelovi staničnih membrana.

Osim lokusa (gena) za glavne antigene tkivne snošljivosti, na tome kromosomskom segmentu, mogu se naći i neki drugi nesrodni geni.

HLA sustav sadržava:

1. gene za sintezu tkivnih aloantigena - geni lokusa HLA-A, HLA-B, HLA-C
2. gene koji određuju specifičnu imunološku reaktivnost T-limfocita jedinke, geni -I_r koji nadziru proizvodnju receptora za prepoznavanje antigena
3. gene koji reguliraju interakciju pomiješanih limfocita i gena koji nadziru proizvodnju antigena vezanih za imunološki odgovor - geni lokusa HLA D/DR - antigena/aloantigena na B-limfocitima
4. gene koji kontroliraju neke komponente komplekta Bf (properdinskog faktora) C2 i C4 komponente komplekta i gene koji reguliraju sintezu nekih antigena na limfocitima
5. Pseudogene i nepolimorfne molekule I. razreda.

Najnovije metode molekulske biologije za razliku od imunoloških metoda pokazale su postojanje nepoznatih, odnosno nove lokuse i alele I. i II. razreda. Procjenjuje se da sveukupno ima do sada 83 HLA-A, 186 HLA-B, i 42 HLA-C alela.

Za neke se pokazalo da sadržavaju pseudogene (HLA-H, HLA-J, HLA-K, HLA-L) koji zaustavljaju kodone ili druge zamjene koji sprečavaju ekspresiju teških lanaca I razreda i da prema tome nisu mogli biti ustanovljeni imunološkim metodama.

Za druge pak lokuse, osobito lokuse I. razreda, pokazalo se da mogu određivati i odgovarajuće molekule.

Takvi lokusi su HLA-E, HLA-F, HLA-G. Po svojim karakteristikama njihove se molekule razlikuju od "klasičnih" molekula HLA-A, -B, -C.

Tako one ne pokazuju polimorfizam ili je on vrlo slab jer postoji i razlika u tkivnoj ekspresiji, kao i kvantitativno relativno niska ekspresija. Noviji podaci međutim pokazuju da se ti kriteriji više ne mogu primijeniti za HLA-G gene (119,120,121).

Produkte gena HLA sustava nazivamo antigenima - to su makromolekule glikoproteini koje nalazimo na membranama stanica ljudskog tijela.

Geni HLA odnosno odgovarajuće molekule/antigene, mogu se grupirati u dva razreda.

Klasični geni /antigeni I. razreda su HLA-A, -B, -C. Nalaze se na većini stanica i tkiva, s time što postoji kvantitativna razlika u ekspresiji. (121).

Tako su najobilnije zastupljene na limfocitima i monocitima/makrofagima, a relativno malo ih ima na mišićnim stanicama, fibroblastima i stanicama živčanog tkiva, a nema ih na eritrocitima;

Prema strukturi i funkciji geni I. razreda HLA podijeljeni su na klasične ili Ia (-A,-B,-C) i neklasične ili Ib (-E,-F,-G).

Smješteni su na kratkom kraku 6. kromosoma unutar 6p21-3 regije. Klasični B i C lokusi smješteni su centromerično, lokus A i neklasični lokusi F i G u telomeričnom dijelu, dok je lokus E smješten između njih.

Geni HLA Ia. i Ib. razreda su glikoproteini teških lanaca smješteni na membranama stanica ljudskog tijela koji su povezani nekovalentno s nepolimorfnim lakim lancem nazvanim β_2 -mikroglobulinom (β_2 -m) kojeg kodira gen na kromosomu 15. Molekularna težina HLA-G je 39 kDa (121).

Geni II. razreda HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DR, kojih se antigeni nalaze na limfocitima B i aktiviranim limfocitima T, dok se na monocitima/makrofagima nalazi HLA-DR i HLA-DP u svim slučajevima, a HLA-DQ u 60-70% makrofaga. Može doći do ekspresije antigena II. razreda i na stanicama bubrežnih tubula, beta stanicama pankreasa i folikularnim dendritičkim stanicama.

Osnovna karakteristika gena i molekula HLA sustava jest polimorfizam.

Neki lijekovi te promjene fiziološkog stanja organizma, stres, trudnoća i starost mogu smanjiti količinu HLA antigena na staničnoj membrani, što valja imati na umu pri njihovom određivanju.

Geni HLA nasljeđuju se kao usko vezani kodominantni geni. Geni lokusa HLA-A, -B, -C, -D što se nalaze na jednom kromosomu 6 čine haplotip koji se "u bloku", kao jedan mendelski faktor nasljeđuje od obaju roditelja.

Dva haplotipa HLA, po jedan naslijeđen od svakog roditelja, čine genotip. Antigeni HLA sastoje se od dva dijela, jednoga koji određuje "privatnu" specifičnost i drugoga koji određuje "opću" specifičnost. Prvi je karakterističan (specifičan) za određeni alel (antigen), a drugi je zajednički ili vrlo sličan za veći broj alela istog lokusa (119,120).

Do danas je na trofoblastu izolirano šest HLA-G izoforma: četiri membranski vezane bjelančevine (membrane-bound) HLA-G₁, -G₂, -G₃, -G₄, i dvije topljive bjelančevine HLA-G₅ i -G₆.

Bjelančevina HLA-G ima 86% istu građu s odgovarajućim sekvencijama bjelančevina HLA-A, -B, -C. Struktura bjelančevine HLA-G₁ ista je kao u klasičnih molekula I. razreda. Tri globularne domene povezane su s β_2 mikroglobulinom.

Molekula HLA-G uključena je u imunološku toleranciju.

Ekspresija bjelančevine HLA-G ograničena je na tkiva ekstraembrijskog trofoblasta koji invadira majčinu deciduu tijekom implantacije embrija. Ekspresija HLA G nađena je nedavno u prvom tromjesečju trudnoće na endotelu

krvnih žila horiona posteljice, kao i u epitelnim stanicama timusa i aktiviranim monocitima periferne krvi.

Ekspresija HLA-G čvrsto je regulirana na nivou transkripcije. Visoka razina prijepisa mRNA HLA-G može se otkriti u stanicama trofoblasta isto kao i u JEG-3 liniji stanica koriokarcinoma, dok je bazalna razina transkripcije HLA-G detektirana u mononuklearnim stanicama periferne krvi i stanicama glije.

Potpuna supresija HLA-G opisuje se u klonovima stanica prirodnih ubojica (NK) i stanicama fetalne jetre u prvom tromjesečju.

Interleukin 10 (IL-10) aktivira transkripciju HLA-G eksplantata ljudskog trofoblasta u prvom tromjesečju, dvostruko djelujući na ekspresiju HLA, prvo poticanjem ekspresije HLA-G dok istovremeno snižava ekspresiju klasičnih antigena prvog i drugog razreda na površini monocita. Uz to, Interferon γ (IFN- γ) pojačava ekspresiju HLA-G proteina na površini monocita i djeluje sinergistički s IL-2 i faktorom koji stimulira kolonije granulocita i makrofaga (GM-CSF) na poticanje ekspresije HLA-G na površini stanica U937 staničnih linija histiocitnog limfoma.

Ovi rezultati sugeriraju da se prolazna ekspresija proteina HLA-G može inducirati različitim stimulusima u bazalnim razinama genske transkripcije HLA-G i ekspresije proteina HLA-G.

Iako je ekspresija HLA-G na stanicama citotrofoblasta dobro potkrijepljena, njena ekspresija na sinciotrofoblastu još je kontroverzna. HLA-G proteini pronađeni su također i na endotelnim stanicama fetusa, pretpostavlja se da one imaju i druge neimunološke funkcije, na primjer u angiogenezi.

Topivi HLA-G u amnijskoj tekućini, pretpostavlja se imaju ulogu u imunološkom međudjelovanju majka-fetus. Poznato je da tijekom trudnoće deciduu infiltrira veliki broj NK stanica neobičnog fenotipa CD56^{hi} CD16⁻ CD3⁻. Odista, prije je izvještavano da su HLA-G+ stanice citotrofoblasta zaštićene od lize decidualnim NK stanicama u oba slučaja - semialogeničkom (majčine uterine NK stanice i njima pripadajući trofoblast) i alogeničkom (majčine uterine NK stanice i trofoblast od različitih majki).

Liza NK stanicama može se obnoviti blokiranjem HLA-G sa specifičnim mAb - monoklonskim protutijelima (122).

YW Loke je pokazao da stanice trofoblasta ostaju otporne na lizu decidualnim NK stanicama unatoč prethodnom tretiranju s monoklonskim protutijelima (123,124). Nadalje, HLA-G ima implikacija u patološkim stanjima trudnoće. Goldman-Wohl i suradnici našli su smanjenu ili odsutnu ekspresiju HLA-G proteina na ekstraviloznom trofoblastu pacijentica s preeklampsijom, što ga čini osjetljivijim na napad majčinog imunološkog sustava (125).

Postojanje HLA-G proteina na ekstraviloznom trofoblastu u ektopičnih trudnoća ukazuje da se njegova ekspresija na stanicama zbiva na autonoman način, a njegova prisutnost na ekstraviloznom trofoblastu parcijalne i totalne molarne trudnoće, pokazuje da je njegova ekspresija neovisna o razvoju embrija i da je dio integralnog razvoja posteljice, dok ekspresija HLA-G u kompletnoj hidatidnoj moli potvrđuje ekspresiju očevih alela HLA-G (126,127). Povrh toga

herpes simplex virus, citomegalo virus u ljudi poremećuju ekspresiju HLA-G. Međutim, nije nađena razlika u populaciji decidualnih limfocita između normalne trudnoće i spontanih ponavljanih pobačaja.

Do danas je opisano **šesnaest alela HLA-G**, četiri od njih nisu sinonimi i mogu kodirati membranski vezane HLA-G proteine: G*01011 ('wild'); Thr31 do Ser; Leu10 do Ile; Thr258 do Met; isto kao jedan skraćeni topljivi protein, del-Cys130. modificirani kodoni 31, 110 i 258 smješteni su izvan brazde za vezanje peptida. Pretpostavlja se da taj polimorfizam ne zahvaća izravno interakcije s vezanjem antigenskih peptida ili TCRs.

G*0105N (koji nosi delCys130 mutaciju) je prvi HLA-G null alel koji se nalazi neovisno u različitim etničkim skupinama (2,3% među bijelcima).

HLA-G geni pokazuju veoma malo polimorfizma u ljudi i bliskih čovjekolikih majmuna (čimpanzi, gorila i orangutana) i ne zahvaćaju niti TCR (T stanične receptore) niti vezna mjesta peptida (122).

Polimorfizam HLA-G sličniji je jednom HLA-C nego HLA-A i -B. Potpunu važnost heterozigotnosti HLA-G otvorila je pitanja moguće uloge indukcije alogeničkog citotoksičkog imunološkog odgovora tijekom trudnoće ili kod alotransplantata (121).

Fujii i suradnici 1994. postavili su hipotezu da topljivi HLA-G izoformi onemogućavaju aloreaktivne citotoksičke limfocite, vezanjem paternalnih alopeptida i međudjelovanjem s T limfocitima.

Drugo važno pitanje s obzirom na polimorfizama HLA-G je: «Je li homozigotnost nekih HLA-G alela nedostatak u terminskim trudnoćama i/ili otpornost na specifične intrauterine mikroorganizme?» (128)

Molekule HLA-G igraju važnu ulogu u imunološkoj toleranciji. Sve do sada, većina studija usmjerila je pažnju se na HLA-G1,-G2 i -G5 izoforme, dok uloge drugih HLA-G izoforma tek treba razjasniti.

Prisutnost HLA-G na epitelnim stanicama timusa potiče pitanje njegovog eventualnog sudjelovanja u T staničnom sazrijevanju u timusu i prepoznavanju s TCRs.

Postavili smo dakle hipotezu da HLA-G igra ulogu u autoimunim bolestima.

Iako i HLA-G i HLA-E pokazuju jednak inhibitorni učinak na funkciju NK stanica, različita je njihova raspodjela u tkivima.

Membranski vezane bjelančevine HLA-E nađene su u epitelnim stanicama amnija i stanicama trofoblata.

Ekspresija HLA-E ovisna je o ekspresiji molekula I. razreda HLA, osim u stanica koje su bez molekula I. razreda HLA, kao što je trofoblast ili varijante-inačice tumora bez I. razreda HLA, gdje je ekspresija HLA-E u potpunosti ovisna o ekspresiji HLA-G. Važno je stoga utvrditi komplemetarne ili sinergističke odnose između ove dvije molekule HLA (122).

Molekule HLA-G nađene su na ekstraviloznim stanicama citotrofoblata, fetalnom oku i timusu, plućima, srcu i bubrezima i jetri u prvom tromjesečju.

Distribucije HLA-G najpreciznije se utvrđuje specifičnim antiHLA-G monoklonskim protutijelima (129).

Antigeni HLA određuju se serološkim metodama, metodama stanične imunologije, imunokemijskim metodama i metodama molekulske biologije.

Geni/antigeni HLA sustava određuju se osnovnom imunološkom metodom - serološki uz pomoć specifičnih poliklonskih seruma dobivenih od višerotkinja i/ili osoba koje su primale više puta transfuziju, ili uz pomoć monoklonskih protutijela što potječu iz B limfocita hibridioma koji se dobiju nakon imunizacije miševa s ljudskim stanicama.

Antigene, kojih proizvodnju nadziru aleli HLA-A, -B, -C serološki se određuje pomoću specifičnih antiseruma.

Najčešće se u tu svrhu rutinski izvodi TEST LIMFOCITOTOKSIČNOSTI (LCT-mikrometoda).

Molekule/antigeni II. razreda HLA-DP, -DQ, -DR, tipiziraju se, kao i molekule I. razreda, pomoću protutijela, ili još i pomoću T limfocita u kulturi pomiješanih limfocita - test MLR (Mixed Lymphocyte Reaction). Test MLR jest test koji pripada skupini testova stanične imunosti. Počeo se primjenjivati zato što u početku nisu postojala protutijela specifična za molekule II. razreda i sekundarni test MLR - modificirani test MLR tzv. test PLT (Primed Lymphocyte Test).

Ne postoje kao poseban entitet molekule HLA-D, Reakciju limfocita u testu MLR zapravo prouzrokuje njihova stimulacija molekulama HLA-DR, -DQ i -DP.

MLR test služi u prvom redu za ustanovljavanje razlike u molekulama DQ i DR, a test PLT s "pravilno" selekcioniranim T-limfocitima za molekule HLA-DP. Primijenjena medicina našla je interes za HLA zbog utjecaja njegovih gena i molekula na ishod operacija pri kojima se presađuju tkiva i organi, zatim da se ustanovi očinstvo ili srodstvo i zbog asocijacije pojedinih alela HLA s bolestima.

Poremećena ekspresija HLA može nepovoljno utjecati na razvoj gameta, na brzinu dijeljena embrija, na oblikovanje blastociste i trofoblasta, te na implantaciju, razvoj i preživljenje fetusa.

Ekspresija HLA na imaturnim spermatozoima može djelovati kao signalna molekula, ili utjecati na diferencijaciju i maturaciju gameta (130).

Ekspresija HLA također odražava povećanu stopu dijeljena stanica embrija i korelira s uspješnijom implantacijom (131). Ekspresija HLA na blastocisti i trofoblastu (132), na invanzivnom trofoblast i na majčinih imunološkim stanicama (133) regulira imunološku aktivnost majke na majčino-fetalnom spoju. Time utječu na implantaciju i kasnije na razvoj ploda/fetusa.

HLA-DR1,-DR3,-DR10 ekprimirani na antigen predočnim stanicama (npr makrofagima) vjerojatno su najbolje molekule za predočavanje trofoblastnog HY antigena T stanicama koje mogu razviti citotoksični antitrofoblastni odgovor.

Studije zatvorenih ljudskih populacija pokazuju da razvoj i preživljenje fetusa može biti pod utjecajem podudarnosti očevih ili majčinih/plodovih osobitih HLA antigena (134,135). Tako reproduksijski neuspjeh može biti rezultat

poremećene ekspresije HLA antigena za vrijeme bilo kojeg razvojnog perioda trudnoće.

CILJ ISTRAŽIVANJA

1. Ukazati na specifično djelovanje imunoglobulina u odnosu na kontrolnu skupinu-uobičajenu intenzivnu skrb (mirovanje, didrogesteron) u liječenju habitualnih pobačaja vjerojatno imunološki uzrokovanih.

2. Ultrazvučno, klinički pratiti trudnoću pod imunoterapijom i u kontrolnoj skupini.
3. Registrati komplikacije porodničkih zahvata u trudnoći i porodu.
4. Uočiti i pratiti nuspojave kod terapije imunoglobulinima.
5. Ispitati koliko razina TNF α i IL-2 u krvi habitualnih pobacilja ukazuje na ishod trudnoće.

ISPITANICE I POSTUPAK

U razdoblju od 1993. do 2003. godine u ispitivanje smo uključili 40 parova s iskustvom od tri i više uzastopnih spontanih pobačaja, prvog tromjesečja, kod kojih smo isključili anatomske, endokrinološke, metaboličke, upalne, autoimunosne i druge uzroke pobačivanja te pretpostavili vjerojatni aloimunološki uzrok pobačivanja (podudarnost u HLA-D antigenima) (Tablica 1). Uz pismeni pristanak parova te uz odobrenje Etičkog povjerenstva KB»Mercur« i Medicinskog fakulteta uključili smo ih u ispitivanje. Nakon

utvrđivanja trudnoće ultrazvukom ili s pozitivnim β -lancom humanog horionskog gonadotropina, zadovoljavanja kriterija za izbor parova, proveli smo prospektivno kontrolirano randomizirano (tablica slučajnih brojeva) kliničko ispitivanje: 20 trudnica liječili smo IVIG-om, a 20 trudnica smo liječili uobičajnom intenzivnom skrbi - mirovanje, didrogesteron. Kod svih ispitanica postojala je podudarnost u HLA-D lokusima među partnerima (Tablica 5, 5a). Sve indikacije postavljene su u našoj klinici. Eritrocitni i leukocitni antigeni ustanovljeni su u Centru za tipizaciju tkiva KBC Rebro u Zagrebu. Da bi se odredili antigene HLA I. i II razreda koristilo se nekoliko metoda. Za pripremanje B+T limfocita iz heparinizirane pune krvi koristili smo mješavinu otopine ficola i triočila koja pri određenim brzinama vrtnje, zbog gradijenta gustoće, odvaja pojedine krvne elemente prema njihovoj specifičnoj težini. Limfocit se tako nađu u prstenastom sloju gornje trećine gradijenta gustoće. Ovaj sloj bogat limfocitima pokupi se, iscentrifugira i ispere u otopini Hanksa. Limfociti su spremni za daljnje testiranje ili se mogu pohraniti za kraće ili duže vrijeme u zamrzivaču na -70°C ili u tekućem dušiku na -190° . Vijabilnost limfocita se može adekvatnim pohranjivanjem održati od 3 mjeseca do nekoliko godina. Da bismo sačuvali stanice prilikom zamrzavanja koristimo se otopinom dimetil-sulfoksida (DMSO 20%-tna). Ona čuva staničnu stijenku od oštećenja koja mogu biti posredovana kristalima leda. Otopinu DMSO i suspenziju stanicam miješamo u omjeru 1:1 i pohranjujemo u zamrzivač na -70°C ili u tekući dušik na -190°C . Tako sačuvane stanice možemo odmrznuti kada se za to ukaže potreba. Postupak odmrzavanja, kojim se očuva vijabilnost stanica, je vrlo jednostavan. Ampule u kojima smo čuvali stanice uronimo u vodenu kupelj ugrijanu na 37°C . Kada se stanice otope, dodamo medij i centrifugiramo da se riješimo otopine DMSO. Nakon centrifugiranja supernatant odlijemo, dodajemo Parker i podešavamo stanice prema potrebi. Iako su HLA antigeni prisutni na svim nukleusnim stanicama u tijelu, postoje ipak i poneki izuzeci. Tako su antigeni II.razreda prisutni mahom na B limfocitima, makrofazima, antigen predočnim stanicama i na T stanicama isključivo i samo kada su iste stimulirane. U perifernoj krvi je odnos B i T limfocita nesrazmjern tako da imamo otprilike 20% B stanica naspram 80% T limfocita. U takvom omjeru je nemoguće koristiti B limfocite za određivanje HLA-DR antigena, pa B limfocite odvajamo iz suspenzije B+T limfocita. Da bismo odvojili T od B limfocita koriste nam ovčji eritrociti prethodno obrađeni s 2-amino-ethyl-isothiuronium bromide-hydrobromide-om (AET). Ovakvi eritrociti vežu na svojoj površini T limfocite u tzv. E-rozete. Jedan ml suspenzije stanica pomiješanih sa 0,2 ml ovčjih eritrocita nanosimo na otopinu fikol-triočila i centrifugiramo:

I 10 min/1500 okr/min

II 15 min/2500 okr/min

Na površini fikol-triočila nalazi se bijeli prsten bogat B limfocitima koje koristimo za tipizaciju HLA-DR antigena. Antigeni HLA-A, B, DR određivani su serološkim testovima, dok su antigene HLA-D određivani testovima miješane kulture limfocita (MLC). Test su uveli 1964. godine Terasaki i MacLleland. Testom mikrolimfocitotoksičnosti određeni su HLA-A, B i DR antigeni prisutni na površini T ili B stanica. Sama metoda sastoji se u tome da serum poznate HLA specifičnosti, dakle serum koji sadrži poznata specifična HLA citotoksička

protutijela, dovedemo u kontakt sa stanicama u tzv. Terasakijevim pločicama. Stanice u čijim membranama postoji vezno mjesto za određeni antigen, vezat će se za specifično protutijelo. Za taj spoj potrebno je 30 minuta. Nakon toga se dodaje serum kunića (tzv. komplement) koji se veže za nastao kompleks antigen-protutijelo na membrani stanica i uzrokuje lizu stanice. Inkubacija traje 60 minuta. Nakon toga se odstrani komplement i serum istresanjem pločice, a stanice se oboje s tripanskim modrilom. Tripansko modrilo će ući u lizirane stanice, obojiti ih plavo, tako da u vidnom polju možemo mikroskopom očitati na kojim je mjestima došlo do reakcije. Očitavanje reakcije bazira se na broju mrtvih stanica, a razlikujemo nekoliko stupnjeva intenziteta:

0-10%	mrtvih stanica = negativna reakcija	0
10-30%	mrtvih stanica = intenzitet reakcije	1
40-50%	mrtvih stanica = intenzitet reakcije	2
60-70%	mrtvih stanica = intenzitet reakcije	3
80-100%	mrtvih stanica = intenzitet reakcije	4

Nakon što smo pod mikroskopom očitali sve reakcije, prema već prethodno poznatom planu tzv. HLA baterije, odredili smo HLA antigene. Na taj način dobili smo fenotip pojedinih osoba koje smo tipizirali (136).

Kariotipovi svih ispitanica i njihovih partnera bili su uredni.

Ginekološke bolesti isključene su ginekološkim pregledom i vaginosonografskim pregledom – aparatom Toshiba SSA-340, vaginalnom sondom od 5,6 i 7 MHz, te abdominalnom sondom od 3 i 3,5 MHz.

Insuficijencija žutog tijela isključena je određivanjem bazalne temperature i nalazom progesterona 22. dana ciklusa. Kultiviranjem brisa cerviksa isključene su aerobne i anaerobne bakterije, a testovima na klamidiju i mikoplazmu isključeni su najčešći mikrobiološki uzroci pobačivanja.

Na osnovi pretpostavke da bi serumska razina abortivnih citokina TNF α i IL-2 mogla ukazivati na ishod trudnoće kod habitualnih pobačija, te mogućnosti povoljnog djelovanja IVIG-a na njihovu razinu, u 53 uzorka seruma od 19 trudnica uključenih u studiju (11 IVIG i 9 kontrola) i u 10 uzoraka seruma od 10 trudnica s normalnom urednom trudnoćom odredili smo Interleukin-2 i TNF α enzimskom metodom ELISA (prema engl. Enzyme-linked immunosorbent assay), koristili smo komercijalne kitove za h-Tumor Necrosis factor- α ELISA (cat.No.1425 943) i h-Interleukin-2 Elisa (cat. No.1 534 483) (Roche Moleculars Biochemicals). Uzorke krvi uzimali smo iz vene u biokemijsku epruvetu kod prijema, svaka tri tjedna, prije davanja infuzije IVIG i u kontrolne skupine, tijekom prvog i drugog tromjesečja trudnoće. Nakon centrifugiranja krvi na 4000 rpm, dobiveni talog se odvoji, a uzorci seruma se pohrane na -20° C u laboratoriju Centra za tipizaciju tkiva KBC «Rebro». Kada su se skupili svi uzorci u njima smo odredili IL-2 i TNF α . Prema upustvima proizvođača senzitivnost testa za TNF α je ≥ 12 pg/ml, dok je raspon mjerenja 20-800 pg/ml TNF α , a za IL-2 senzitivnost je $\geq 2,4$ pg/ml i raspon mjerenja 15-800 pg/ml IL-2. Sve vrijednosti ispod najniže granice senzitivnosti definirane su kao najniža standardna krivulja vrijednosti koja se smatra negativom ili 0.

Odredili smo srednje vrijednosti IL-2 i TNF α u serumima trudnica za tri perioda: 1. period (4 - 12. tjedna trudnoće); 2. period (13 - 24. tjedan trudnoće) 3. period (25-36. tjedan trudnoće).

Liječenje smo započeli odmah nakon dokaza trudnoće pozitivnim beta horionskim gonadotropinom i/ili vaginosonografskim pregledom, obično između 4 –5. tjedna trudnoće, ili polaganom infuzijom u vremenu od dva do tri sata, 30 grama (0,5 do 0,6 g/kg tjelesne težine) humanog imunoglobulina za intravensku primjenu ili u kontrolnoj skupini davanjem tableta didrogesterona a 10mg 3x1 tbl, uz mirovanje. Sljedećih pet do šest infuzija od po 20 grama (0,3 - 0,4 g/kg tjelesne težine) imunoglobulina, slijedilo je u razmacima od tri tjedna do 22 ili 24 tjedna trudnoće svaka trudnica dobila je najviše 130 do 150 gr IVIG-a.

Preparat IVIG je proizveden u Imunološkom zavodu u Zagrebu (137).

Preparat IVIG proizveden je iz ljudske plazme prikupljene od oko 2000 dobrovoljaca. Svaka pojedinačna doza bila je mikrobiološki ispitana na HBV, HCV, HIV i Treponemu pallidum. Imunoglobulinska frakcija dobivena je frakcioniranim taloženjem etanolom na temperaturi ispod 0°C, termički obrađena 48 sati na +45° C i prevedena u intravenski oblik postupkom “pH4”. Preparat je sadržavao 97% IgG, 1,5% IgA i 1,5% albumina. Makromolekulski sastav bio je >12S, 5% 10S i 89% 7S, a u njemu nije bilo moguće otkriti prisutnost razgradnih fragmenata Ig. Sterilna otopina s 50 g/l proteina testirana je na pirogenost, antikomplementarnost i stabilnost.

Didrogesteron tbl à10 mg primjenjivali smo do 12. tjedna trudnoće. I jednu i drugu skupinu ispitanica naručivali smo na kontrolne preglede svaka tri tjedna.

Svakoj trudnici s indikacijom prije početka liječenja učinjena je sljedeća obrada:

- *Laboratorijske pretrage:* SE, KKS, URIN, GUK, OGTT, APTV, mali koagulogram, markeri hepatitisa, KG i Rh, testovi senzibilizacije, Beta HCG, antikardiolipinska protutijela, lupus antikoagulans, TNF α i IL-2
- *Mikrobiološke pretrage:* urinokultura, bris cerviksa,
- *Ultrazvuk-transvaginalno:* veličina gestacijskog mjehura, udaljenost tjeme- trtica, veličina žumanjčane vreće, ustanovljenje srčane akcije,
- Klinički pregled,
- Nativni pregled vaginalnog iscjетка i citološki obrisak za Papanicolaouov test.

U drugom boravku u 8. tjednu trudnoće učinjen je ultrazvučni kontrolni pregled transvaginalno, klinički pregled, Beta korionski gonadotropin (HCG) i APTV (aktivirano parcijalno trombloplastinsko vrijeme).

U trećem boravku u 11-12. tjednu učinjen je ultrazvuk transvaginalno i transabdominalno, (odredio se biparijetani promjer, udaljenost tjeme-trtica, nuhalno zadebljanje, dinamika ploda, dinamika spajanja amnija s horijem) i klinički pregled, TNF α , IL-2.

U četvrtom boravku s 15-16. tjedana trudnoće učinjeni su klinički pregled, ultrazvučni pregled transabdoimanalno (BIP, femur, opseg abdomena, nuhalno zadebljanje, sijelo posteljice, morfologija i dinamika ploda), određeni su bio-

kemijski markeri na aneuploidiju –Double test iz krvi trudnice (alfa-fetoprotein, beta-humani korionski gonadotropin).

U 18. tjednu učinjen je klinički pregled i testovi senzibilizacije

U 23. tjednu učinjen je glukoza tolerans test, klinički pregled, ultrazvučni pregled (BIP, femur, opseg abdomena).

U 28. tjednu učinjen je klinički pregled

U 32-34. tjednu ponovljen je klinički pregled, testovi senzibilizacije u Rh negativnih trudnica, APTV, transabdominalnim ultrazvukom-kontrolira se BIP, femur, opseg abdomena, dinamika i morfologija ploda Učini se i kardiokografija.

U 36. tjednu: obavljen je klinički i ultrazvučni pregled (BIP, femur, opseg abdomena), testovi senzibilizacije u Rh negativnih trudnica, kardiokografija.

U 38. tjednu: učinjen je klinički pregled, amnioskopija, kardiokografija.

U 40 tjednu: ponovljeni su klinički pregled, amnioskopija, kardiokografija .

Statističke metode

Primjenjene su univarijantne metode statističke analize da bi se testiralo postoje li značajne razlike u razdiobi (distribuciji) obilježja (varijabli) bolesnica s obzirom na liječenje. Za testiranje tih razlika kod diskretnih obilježja korišten je χ^2 test, odnosno Fischerov egzaktni test za relativno male broj pojavljivanja određene varijable u ćeliji (manje od 5). Za testiranje razlika u razdiobi kontinuiranih obilježja između dviju grupa korišten je neparametarski Wilcoxonov rank-sum test. Svi su testovi rađeni uz razinu značajnosti od 0,05. U statističkoj analizi korišten je programski paket SAS[®] system na Windows 95 platformi.

REZULTATI

Cilj analize je usporediti bolesnice liječene IVIG-om (20 ispitanica) s kontrolnom skupinom, te utvrditi postoji li razlika između ovih skupina u nekim od mjerenih obilježja.

Sve ispitanice bile su primarne pobačije. U skupini IVIG ispitanice bile su u dobi od 24 do 40 godina, te prosječne dobi 31,8 godina. Od dvadeset trudnica 17 je rodilo što je 85% (17/20). Tri trudnoće okončane su pobačajem u prvom tromjesečju, što je 15% (3/20). Broj živorođene djece iz 17 poroda je 19 (jedni

trojci). Jedno novorođenče umrlo je 3 sata po porodu zbog nezrelosti (28. tjedana), zastoja u rastu 400gr/25cm, eklampsije majke.

U kontrolnoj skupini ispitanice su bile u dobi od 22 od 36 godina, te prosječne dobi 29,7 godina. Od 20 ispitanica 2 su pobacile, 18 je rodilo. Jedna blizanačka trudnoća okončana je u 26. tjednu. Jedan dvojak umro je odmah po porodu, a drugi dan nakon poroda. Jedna trudnoća završena je carskim rezom u 34. tjednu zbog pogoršanja univerzalnog hidropsa ploda nepoznate etiologije. Novorođenče je umrlo isti dan 12 sati nakon poroda.

Stopa uspjeha je 90% (18/20). Broj živorođene djece iz 18 poroda je 19.

Kao kriterije uspjeha terapije uzeli smo trudnoće i porode iznad 24. tjedna gestacije.

Stručna sprema ispitanica i njihovih supružnika je podjednaka, u obje ispitivane skupine. Učestalost krvnih grupa u IVIG/kontrolnoj skupini jednaka je kao u općoj populaciji.

Kariotipovi pobačenih zametaka bili su uredni.

Novorođenče tjelesne težine pri porodu ispod 10. percentile smatra se malim za gestacijsku dob (138).

Indikaciju za terapiju postavili smo u Kliničkoj bolnici «Merkur».

Od 40 ispitanica uključenih u studiju tri su rodile u Splitu, jedna u Karlovcu, jedna u Bjelovaru.

Ukupan broj pobačaja u IVIG skupini je 73, ili prosječno 3,7 po trudnici, dok je 60 u kontrolnoj skupini ili 3,0 po ispitanici.

U grupi IVIG:

učestalost prijevremenog poroda je 17,64% (3 od 17 porođenih). Deset poroda od sedamnaest završeno je carskim rezom zbog opstetričkih indikacija ili 58,82% (prijevremeni porod, eklampsija, zadak, IUGR, asfiksija ploda, višeploidne trudnoće)

Tri trudnice imale su H-gestozu što je 17,64% (3 od 17 poroda), s time da je jedna od njih u 28. tjednu imala eklampsiju s krvarenjem u mozak. U tri trudnice zbog prijetećeg prijevremenog poroda započeto je liječenje ritodrinom intravenski i per os (3 od 17). Zbog inkompetencije cerviksa u 5 trudnica učinjena je serklaža što je 29,41% (5 od 17) na broj poroda ili 25% ako se uzmu sve ispitanice (5 od 20). Dva novorođenčeta bila su manja za gestacijsku dob. Srednja gestacijska dob pri porodu je 38,11 tjedna (od 29 do 41 tjedan). Srednja tjelesna težina novorođenčeta je 2863,2g (u rasponu od 400 do 3650g). Ako se isključe višeploidne trudnoće onda je srednja porodna težina novorođenčeta 2940,6g (Tablice 2, 6, 7).

U kontrolnoj skupini učestalost prijevremenog poroda je 16,66% (3 od 18). Ritodrinom intravenski ili per os zbog prijetećeg pobačaja liječeno je 5 trudnica. Kod 6 ispitanica učinjena je serklaža zbog inkompetencije cerviksa što je 33,33% (6 od 18 poroda) ili 30% ako su računaju sve ispitanice (6 od 20). Pet

poroda zbog opstetričkih indikacija dovršeno je carskim rezom ili 27,77% (5 od 18). Srednja gestacijska dob pri porodu je 36,16 tjedana (od 26 do 41 tjedan). Srednja tjelesna težina novorođenčeta je 2925,8g (u rasponu od 480g do 4350g). A ako se isključi višeploidna trudnoća, onda je srednja tjelesna težina novorođenčeta pri porod 3210,6g.

Srednja tjelesna težina trudnica prije poroda u IVIG skupini je 68,8kg, odnosno 71,7kg u kontrolnoj skupini. Prosječno su trudnice u IVIG skupini dobile 15,2kg a u kontrolnoj skupini 16,1kg. Tjelesna visina trudnica u obje skupine bila je podjednaka, u IVIG skupini prosječna visina je 163,7cm a u kontrolnoj skupini 165,9cm (Tablice 3,6,7).

Srednja vrijednost koncentracije TNF α i IL-2 u serumu IVIG/kontrole kroz sva tri promatrana perioda nisu pokazale statistički značajnu razliku.

Srednja vrijednost TNF α zdravih trudnica u 1. periodu je 23,2 pg/ml, dok je u IVIG skupini 58,8 pg/ml i kontrolnoj skupini 65,7 pg/ml. Statistički je značajno viša koncentracija TNF α u serumu habitualnih pobačaja u odnosu na zdrave trudnice.

Nema statistički značajne razlike u koncentraciji IL-2 u serumu zdravih trudnica u odnosu na habitualne pobačaje. Srednja vrijednost koncentracije IL2 u zdravih trudnica u 1. periodu je 73,66 pg/ml, a u habitualnih pobačaja –u skupini IVIG 85,9 pg/ml i 84,6 pg/ml u kontrolnoj skupini.

Od 20 ispitanica koje su primale IVIG kod 6 pojavile su se blage nuspojave i to uvijek pri primanju prve doze. To su glavobolja (n=4), mučnina (n=1), osjećaj vrućine (n=1), temperatura do 38° C (n=1), crvenilo kože (n=1), tresavica (n=1). Smanjivanjem brzine infuzije simptomi su se povlačili (Tablica 4).

Ukupno je rođeno 20 dječaka i 18 djevojčica.

Od 40 ispitanica uključenih u studiju, naknadno je 14 zanjelo i rodilo bez ikakve terapije živu i zdravu djecu, od toga četiri iz IVIG skupine i deset iz kontrolne skupine. Pet ispitanica naknadno je zanjelo i pobačilo u prvom tromjesečju. Od tih 5 tri su zanjele još jednom rodile zdravu djecu.

Svi podaci prikazani su u tablicama na kraju teksta (Tablice od 2 do 8c).

Krvna slika, ispitivani parametri koagulacije bili su u granicama normale, kao i sve druge ispitivane laboratorijske pretrage. U svih trudnica isključena je upala, lokalna ili sistemska.

U Tablici 6 dane su frekvencije za diskretna obilježja: stručna sprema, krvna grupa, Rh faktor ispitanica; stručna sprema, krvna grupa, Rh faktor supruga; broj prethodnih poroda i pobačaja, gornja granica duljine krvarenja, početak liječenja. Između ispitanica liječenih IVIG-om i kontrolne skupine nije uočena značajna statistička razlika u promatranim obilježjima.

Izuzetak je jedino broj prethodnih pobačaja ($p=0,0004$ za Fisherov egzaktni test).

Dok su u kontrolnoj skupini sve ispitanice imale 3 prethodna pobačaja, u skupini liječenih IVIG-om takvih je 10, jedna ispitanica imala je 2 pobačaja dok ih je 9 imalo 4 i više pobačaja.

HLA status ispitanica prikazan je u Tablicama 5, 5a, 5b.

Između dvije skupine ispitanica nema statistički značajne razlike u HLA statusu. HLA-DR1 antigen prisutan je kod 5 ispitanica u IVIG skupini i u 4 ispitanice u kontrolnoj skupini. Tri ispitanice u IVIG skupini imaju -DR3, a u kontrolnoj skupini -DR3 imaju 4 ispitanice. U skupini IVIG nijedna pacijentica nema -DR1 i -DR3, dok u kontrolnoj skupini jedna pacijentica ima oba antigena. Osam ispitanica iz IVIG skupine i 7 iz kontrolne skupine ima barem jedan od antigena, ili -DR1 ili -DR3.

Neprekidna (numerička) obilježja su prikazana u Tablici 7. Uspoređene su dob ispitanica, broj prethodnih pobačaja, donja granica duljine ciklusa, gornja granica duljine krvarenja, težina i duljina novorođenčadi, tjelesna težina ispitanica prije poroda, te prirast tjelesne težine tijekom trudnoće i tjelesna visina ispitanica. Težina i duljina novorođenčadi su prikazani za svu novorođenčad te posebno za novorođenčad iz jednoplodnih trudnoća. Prikazan je i početak i završetak imunoterapije, i broj ciklusa imunoterapije.

Kao i kod diskretnih obilježja i ovdje nema statistički značajne razlike između IVIG i kontrolne skupine u svim navedenim obilježjima, osim kod broja prethodnih pobačaja. Ispitanice iz IVIG skupini imale su značajno više prethodnih pobačaja, u odnosu na ispitanice iz kontrolne skupine (3,7 u odnosu na 3,0, $p=0,004$ za Wilcoxonov rank-sum test).

U Tablici 8 prikazana je koncentracija citokina TNF α i IL-2 u serumu za svaki od tri perioda (od 4-12. tjedana; od 13-24. tjedna; od 25-36. tjedna) izračunata je srednja vrijednost mjerenja za svaku ispitanicu. U prvom periodu su IL-2 i TNF α izmjereni kod 10 ispitanica iz IVIG skupine i 8 ispitanica iz kontrolne skupine. U drugom periodu su IL-2 i TNF α izmjereni kod 11 ispitanica u IVIG skupini, a u kontrolnoj skupini IL-2 izmjeren je u 8, a TNF α kod 7 ispitanica. U trećem periodu su IL-2 i TNF α izmjereni kod po jedne ispitanice u svakoj skupini.

Niti u prvom niti u drugom periodu nema značajne razlike između dvije skupine u koncentraciji IL-2 i TNF α (Wilcoxonov rank-sum test).

Vidljivo je da su mjerene koncentracije citokina u ove dvije skupine znatno više nego kod zdravih trudnica.

Usporedbom mjerenja IL-2 i TNF α u prvom periodu kod 4 zdrave trudnice i 18 habitualnih pobačaja (IVIG i kontrolne skupine) (Tablica 8a) dobiveno je da je koncentracija IL-2 kod habitualnih pobačaja veća nego u zdravih trudnica (85,3 prema 73,7), ali ova razlika nije statistički značajna.

Dok je srednja vrijednost koncentracije TNF α seruma u 1. periodu u habitualnih pobačaja (IVIG i kontrolna skupina) 61,8 pg/ml što je statistički značajno više od 23,2 pg/ml u zdravih trudnica ($p=0,002$; Wilcoxonov rank-sum test).

U svih ispitanica koncentracija TNF α u serumu je iznad granice senzitivnosti (>12 pg/ml).

Koncentracija IL-2 u 1. periodu u 4 ispitanice (40%) IVIG skupine i 2 ispitanice kontrolne skupine (25%) manja je od 2,4 pg/ml. U 2. periodu također 4 ispitanice iz IVIG skupine i 2 ispitanice iz kontrolne skupine imaju koncentraciju IL-2

manju od 2,4 pg/ml. Ne postoji značajna razlika između skupina u broju ispitanica s koncentracijom IL-2 manjom od 2,4 pg/ml.

Usporedba koncentracije TNF α i IL-2 u serumu zdravih trudnica, IVIG i kontrolne skupine te podatke jedne ispitanice koja je pobačila prikazani su u Tablici 8b. Koncentracija TNF α u serumu jedne habitualne pobačilje u IVIG skupini čija trudnoća je okončana pobačajem u 13. tjednu niža je (27,2 pg/ml) u odnosu na koncentraciju TNF α uspješno završenih trudnoća iz IVIG (58,8 pg/ml) i kontrolne skupine (65,7 pg/ml)

RASPRAVA

Na pitanje koji su mehanizmi uključeni u uspješnu supresiju imunološkog odgovora majke protiv očevih ili fetalnih antigena ne zna se odgovor. Znanstvena potpora teoriji, po kojoj su habitualni pobačaji posljedica aloimune reakcije slične odbacivanju transplantata protiv očevih HLA antigena fetusa oskudna je, dok naprotiv postoje uvjerljivi dokazi da u implantaciji, ranoj invaziji trofoblasta i patogenezi habitualnih pobačaja igraju ulogu decidualne NK stanice. Pomoćničke T (Th) stanice žena s habitualnim pobačajima reagiraju protiv antigena trofoblasta *in vitro* sekrecijom uglavnom interleukina- 2 i interferona- γ (takozvani Th1 odgovor), koji poznato je inhibira rast trofoblasta. Sklonost prema Th1 reakciji na antigene možda determiniraju geni HLA II.razreda. U

skladu s ovim kontrolne prospektivne studije ukazuju da majčin histokompatibilni haplotip s DR1 i DR3 alelima daje osjetljivost na habitualne pobačaje. Povećana učestalost autoprotutijela u žena s habitualnim pobačajima kompatibilna je s teorijom Th1 odgovora protiv trofoblasta kao uzroka (sindrom), ali autoprotutijela sama po sebi vjerojatno ne uzrokuju habitualne pobačaje (18). Multiple autoimune abnormalnosti nađene su samo u žena s neobjašnjenim fetalnim gubitcima, te je opravdana pretpostavka da su ponavljani neuspjesi trudnoće možda marker za subklinička autoimuna oboljenja i daljnja prijekoncepcijska obrada potrebna je u svrhu isključenja autoimunih bolesti i eventualno liječenje kod žena koje habitualno pobacuju (13). Za preživljenje embrij mora stimulirati majčin imunološki odgovor da ga zaštiti od citotoksičnih molekula.

Moderna razmatranja haploidentičnog fetusa kao alografta u genetički nesrodnih trudnoća razvila su se iz početnih istraživanja Medawara, Brenta i Bilinghama, do kojih su došli na osnovi rada na toleranciji transplantata. Tim postulatima pokušava se objasniti preživljenje i održanje fetusa kao alotransplantata u antigenski potpuno različitoj majci (139). Te razlike mogu se odnositi na sljedeće antigenske specifičnosti:

1. antigene krvnih grupa (AB0, Rh, itd.);
2. antigene tkivne snošljivosti (HLA-A, -B, -C, -D/DQ);
3. antigene specifične za organ (posteljčni TLX antigen);
4. antigene specifične za tumor (koriokarcinom).

Prema spomenutim postulatima:

1. fetus nije imunogeničan zbog nezrelosti fetalnih antigena,
2. trudnoća mijenja imunološki odgovor majke,
3. uterus je imunološki povlašteno mjesto,
4. posteljica čini imunološku barijeru između fetusa i majke.

Odbačene su pretpostavke o nezrelosti fetusnih antigena i o uterusu kao imunološki povlašteno mjestu.

Povlaštenim mjestima nazivamo tkiva ili organe koji, zahvaljujući specifičnoj građi, a prije svega odsutnosti limfne drenaže, na neki način izoliraju alotransplantate, tako da njihovi antigeni ne budu prezentirani limfatičkom aparatu. Takva mjesta jesu npr. vrećice u hrčkovim obrazima, a kod ljudi mozak i prednja očna komorica. Uterus, međutim, ne možemo ravnopravno svrstati u povlaštena mjesta jer nije preko potreban za normalan ishod trudnoće, a ima limfnu drenažu (primjeri ektopičnih trudnoća).

U preživljenju fetusa kao alotransplantata prije se veliko značenje pridavalo općemu specifičnom slabljenju imunološke reaktivnosti majke u trudnoći.

U dobro kontroliranim kliničkim istraživanjima ustanovilo se da majka dulje nosi kožne transplantate koji potječu od njihovih potomaka u usporedbi s nesrodnim davateljima.

Dokazano je da je imunološka reaktivnost oslabljena u prvoj i posljednjoj fazi trudnoće, a u preostalim fazama pojačana ili nepromijenjena (140).

Posteljica kao anatomsko fiziološka barijera, koja potpuno razdvaja majčinu i fetalnu cirkulaciju, vjerojatno je jedan od najvažnijih zaštitnih mehanizama s hemodinamskoga i imunološkog stajališta. Barijeri se pripisuje i funkcija zaštite od imunoloških posljedica.

Fetus nije nikada u izravnom dodiru s majčinim tkivom, stoga se mnogi zaštitni mehanizmi se odvijaju na majčino-fetalnom spoju u posteljici. **Prvi** materno-fetalni odnos je na mjestu implantacije gdje stanice ekstraviloznog citotrofoblasta invadiraju bazalnu deciduu i susreću se s majčinim imunim stanicama kao što su NK stanice, T stanice i makrofazi. **Drugi odnos** je u majčinim spiralnim arterijama; tijekom placentacije, endotelne stanice majke progresivno se zamjenjuju s endovaskularnim trofoblastom koji dodatno migrira u majčinu krv. **Treći odnos** je sinciotrofoblastni sloj (layer), čija je linija na vanjskom dijelu korionskih resica i u izravnoj su vezi s majčinom krvlju u interviloznom prostoru od 12 tjedna gestacije (141).

Za preživljenje fetusa u imunološko kompetentnom domaćinu vjerojatno je najodgovorniji lokalni mehanizam, odnosno posebna svojstva tkiva koja posreduju između majke i fetoplacentne jedinice, a imunosupresijski učinak decidualnih limfocita na lokalnoj razini navodi se kao jedan od mogućih mehanizama koji doprinose preživljenju fetusa (142). Trofoblast je ključna struktura koja ima nekoliko imunoloških funkcija, od koji su neke razjašnjene na drugim vrstama: slaba antigenost, što štiti od imunološka oštećenja citotoksičnim limfocitima ili citotoksičnim protutijelima; fizička barijera; novačenje signala koji uzrokuju migraciju limfocita u uterine limfne žile i deciduu te suprimiraju reakciju majke; lokalna produkcija progesterona i drugih imunosupresijskih hormona; pojačana proizvodnja blokirajućih faktora omogućuje vezanje više antigenih mjesta (13). Upravo stanice trofoblasta čine granični sloj fetoplacentnog alotransplantata, pa su u izravnom fizičkom kontaktu sa stanicama majčinoga imunog sustava, koje se nalaze u krvi ili decidui. Trofoblastne stanice prva su vrsta stanica koje se diferenciraju nakon oplodnje i čine stanice posteljice i ekstra embrijskih membrana koje okružuju zametak.

Kod ljudi sinciotrofoblast čini površni sloj stanica korionskih resica posteljice. One čine kontinuirani sloj stanica bez međustaničnih spojeva. Ispod sinciotrofoblasta, unutar strukture resice, nalazi se jednostaničan sloj citotrofoblasta. Preko sinciotrofoblasta fetus se hrani, diše i održava na životu. Molekularna ekspresija tih stanica odražava širok izbor njihovih esencijalnih bioloških funkcija.

Postoji posebna populacija invazivnoga ekstraviloznoga jednostaničnog citotrofoblasta koji migrira u decidualno promijenjen endometriju i također proliferira postranično oblikujući korionske membrane. Ekstravilozni citotrofoblast s obzirom na smještaj u decidualno promijenjenom endometriju dijelimo na intersticijski i endovaskularni. Za kliničare svakako je bitniji endovaskularni trofoblast kojega se invazija odvija u dva vala. Prvi val odvija se u prvom tromjesečju trudnoće i ograničen je na decidualne segmente spiralnih arterija, a

drugi val u drugom tromjesečju (do 18. tjedna) te zahvaća njihove miometrijske segmente (143).

U ranoj trudnoći te stanice ekstraviloznog trofoblasta pokazuju biološke karakteristike tumorskih stanica s njihovim proliferativnim i invazivnim osobinama, koje uglavnom prestaju nakon prvog tromjesečja.

Fetalni trofoblast razvija nekoliko mehanizama kojima se može odlučno zaštititi od majčinoga citotoksičnog napada. Prvo, ljudski posteljni vilusni citotrofoblast i sinciotrofoblast ne ekspimiraju klasične polimorfne antigene razreda I i II HLA (144,145) i čini se da se temeljna HLA-ekspresija ne može inducirati ikojim do sada poznatim up-regulatorom (npr. gama-interferonom).

Sinciotrofoblast sintetizira i luči indolamin 2,3-dioksigenaza (IDO), enzim koji katabolizira bjelančevinu triptofan.

On je bitan za uspjeh trudnoće u miša. IDO vjerojatno smanjuje ili inhibira neke imunološke reakcije odbacivanja ubrzavajući razgradnju triptofana imunoloških stanica u posteljici majke (146).

Embrij stvara svoju vlastitu mikrookolinu preko autokrinih signala, prividno neovisno od egzogenih čimbenika sve do stadija blastociste. Jasno je da iako je *in vitro* razvoj preimplantacijskog embrija moguć, je on sporiji nego u *in vivo* okruženju. Potvrda autokrine kontrole razvoja preimplantacijskog embrija je veće preživljenje i bolji razvoj embrija kod povećane koncentracije sekrecijskih produkata u mikrookruženju (147). Ova promatranja dokazuju da se prepoznavanje trudnoće i do izvjesnog stupnja njenog razvoj može odigrati na različitim mjestima unutar organizma. Embrij prije implantacije stvara signale, koji izvršavaju dva komplementarna cilja: zaštićuju embrij od majčine imunološke reakcije i istovremeno podupiru razvoj povoljnog mjesta nidacije (148). Ranije se pretpostavljalo da je trudnoća udružena s imunološkom supresijom koja dopušta embriju uspješan rast i razvoj. Raspoloživi podaci, međutim, ne podupiru takvo viđenje. Imunološki sustav više se prilagođava nego što stvarno djeluje supresijski. Signali koji potječu od embrija javljaju se kratko nakon oplodnje. Ovi signali nisu samo lokalni već prilično brzo postaju opći u organizmu. Tako se nalaze u cirkulaciji majke već nekoliko dana prije implantacije. S obzirom na lokalne signale, ligandi stanične površine i adhezijske molekule vjerojatno igraju ulogu tijekom boravka embrija u jajovodu. Uloga ovih prepoznatih elemenata na površini stanice uveliko se povećava tijekom procesa implantacije. Kada embrij stigne u materišće, koje je privilegirano mjesto za implantaciju, nekoliko lokalnih čimbenika preuzme ulogu. To postaje evidentno kod *in vitro* sustava ko-kultiviranja endometrija i blastociste isto kao i u *in vivo* studijama.

Među čimbenicima koji bi bili uključeni u taj pojačani implantacijski dijalog su sekrecijski produkti endometrija, površinske molekule stanica isto kao i oni od embrija. Oni uključuju, LIF (leukeima inhibitory factor), estradiol 17b, progesteron, hCG, za trudnoću specifični plazma protein C, rilizing faktori histamina, prostaglandini i inhibini.

Postoje dakle dva puta prepoznavanja embrijskih signala od strane majke. **Prvi je lokalni**, stanični put koji se odnosi na površinske receptore stanice i

komponente uključene u prepoznavanje i adheziju, dok je **drugi** sustav humoralan, embriji oslobađaju spojeve koji dohvaćaju udaljena mjesta i vode do sistemskog prepoznavanja trudnoće. Drugi put može stvarno prethoditi prvom. Postoji jasna potreba za identifikacijom specifičnih embrijskih signala koji su uključeni i u imunološku modulaciju. Oni mogu pomoći pri upućivanju u tajne prepoznavanja trudnoće. Takvi signali prisutni su samo u vijabilnoj trudnoći. Luči ih embrij prije implantacije i otkriveni su u sustavnom krvotoku. Unutar 24 sata od koncepcije oplođeno jajašce proizvodi poticaj za sintezu molekule poznate pod imenom “rani faktor trudnoće” (early pregnancy factor - EPF). EPF najprije proizvodi žuto tijelo, a potom sama blastocista. Postavljena je hipoteza da EPF inhibira destrukciju oplođenog jajašca prije njegove implantacije u maternici. EPF *in vitro* djeluje kao supresor funkcije T-limfocita, a nedavno je nađeno da smanjenje aktivnosti EPF korelira sa spontanom pobačajem (148).

EPF u serumu trudnih žena opisan je prije 20 godina. Otkriva se testom inhibicije roseta (RIT), semikvantitativnom metodom koja je kompleksna za izvođenje i teška za ponavljanje (149). EPF nije specifičan za trudnoću. Eksprimiraju ga preimplantacijaski embrij, embrionalni organi isto kao i posteljica, a također je prisutan nevezano za trudnoću u nekoliko tkiva i organa koji se regeneriraju, u karcinomskom serumu, te u kulturi medija nekoliko staničnih linija i čak u kulturama kvasnica (150). Postoji nesuglasje u točnom utvrđivanju EPF. Njegova aktivnost, pojačana je dodatkom PAF (platelet activating factor) stanica slezene. Uz to, serum trudnica, za razliku od seruma netrudnica, inducira aktivnost EPF. Prema najnovijima podacima, iako protutijela za EPF ne utječu na razvoj blastociste miša, ona smetaju rastu trofoblasta. To upućuje i na neizravno djelovanje EPF na embrij preko autokrinog luka. Postoji također izravno djelovanje na embrij ili na mjesto implantacije (151). Protutijela za EPF smještene su većinom u trofoektodermu s veoma malo vezanja na unutarnji sloj stanica (mjesto za stanice koje kasnije dovode do razvoja embrija). Dakle, EPF može djelovati kao imunosupresijski čimbenik i kao faktor rasta (151).

U mnogih sisavaca EPF perzistira u serumu sve do dvije trećine trudnoće. EPF i njemu pridružene molekule suprimiraju proliferaciju T i B limfocita, vezujući se na specifične receptore koje eksprimiraju limfociti nakon stimulacije mitogenima. Postojanje aktivnosti slične EPF u embrija korelira s uspješnošću trudnoća u pacijentica podvrgnutih IVF postupcima. EPF može djelovati zajednički s folikulostimulirajućim hormonom i estradiolom na razvoj folikla isto kao na rano dijeljenje stanica embrija kod IVF. EPF je uključen u imunološki odgovor prisutan u trudnoći. Međutim budući da nije specifičan za embrij, EPF ima ograničenu ulogu u kliničkoj procjeni vijabilnosti embrija prije implantacije (148).

Čimbenik aktivacije trombocita (PAF- platelet activating factor) su razred acetiliranih glicero fosfolipida niske molekularne težine nađeni u mediju koji okružuje embrij kratko nakon fertilizacije. Pretpostavlja se da je u miša i ljudi PAF odgovoran za prolaznu trombocitopeniju prisutnu kratko nakon fertilizacije. U trudnica PAF je nađen u folikularnoj tekućini, endometriju i amnijskoj tekućini. U netrudnih žena PAF ima ulogu u interakciji među stanicama, promjenama permeabilnost žilja, aktivaciji upalnih procesa i imunoregulaciji

odbacivanja transplantata. PAF ekspimiraju leukociti, trombociti i endotelne stanice. Nađen je u kulturi medija oplođenih jajašca unutar osam sati od ferilizacije. Vijabilniji embriji luče veću količinu PAF nego oni manje vijabilni. PAF pomaže transportu embrija u jajovodu. Najveća ekspresija PAF-a je u dvostaničnom embriju i pada nakon toga. Dodavanje PAF embrijskoj kulturi ima različite rezultate. U nekih slučajeva nema djelovanja dok u drugim ima štetno djelovanje na embrijsku vijabilnost u miša i smanjuje volumen blastociste (148).

Interferon alfa, limfokin s imunomodulatornim svojstvima, prisutan je u visokoj razini u fetalnoj cirkulaciji i posteljici, ali odsutan iz majčinog seruma. Nasuprot tome, fetalni limfociti znatno su insuficijentni u produkciji drugog oblika interferona, interferona gama, koji je jaki aktivator stanica prirodnih ubojica (NK stanica) i citotoksičnih limfocita.

Interferon gama također se pokazao kao jaki poticatelj ekspresije HLA- antigena I. razreda.

Sniženje sinteze interferona gama smanjilo bi stoga ekspresiju trofoblastnih HLA-antigena.

Povećana proizvodnja interferona alfa i snižena proizvodnja interferona gama dalji su mehanizam koji doprinosi održavanju imune tolerancije fetalnog alo-grafta (152).

Membrana trofoblasta ima složenu strukturu od najmanje 20 do 30 proteinskih podjedinica, od kojih mnoge, barem potencijalno, mogu stimulirati produkciju imunih protutijela (TLX antigen, onkotrofoblastni/onkofetalni antigeni, placentna alkalna fosfataza, karcinoembrijski antigen, epitektin, transferinski receptori, alfa fetoprotein, F9-teratoma antigen; placentni antigeni - HCG, beta 1 glikoprotein (SP1), retroviralni antigen) (153).

Stanice trofoblasta pokazuju neke jedinstvene imunološke obrasce zbog kojih čak svi klasični HLA I i II antigeni ekspimirani na većini drugih ljudskih staničnih linija nisu ekspimirani ni na jednoj podvrsti trofoblastnih stanica. Jedini HLA antigeni ekspimirani na trofoblastu su izgleda HLA-G,-E, i -C. HLA-E pokazuje veoma ograničeni polimorfizam (dva funkcionalna alela), ali je ekspimiran na većini ljudskih staničnih linija, uključujući i epitelne stanice amniona (154). Veća pažnja upućena je na HLA-G, jer je njegova ekspresija ograničena na ekstravilozni trofoblast. HLA-G pokazuje ograničeni polimorfizam, iako izgleda pokazuje ekstenzivni polimorfizam u američkih crnaca (155). Klasični HLA-C također je ekspimiran na stanicama trofoblasta (18)

HLA-G veže KIRs (killer-cell immunoglobulin-like receptors) NK stanica na isti način kako to čine i druge HLA molekule. Ova interakcija blokira citotoksično djelovanje NK stanica i može doprinijeti toleranciji konceptusa, smanjenjem aktivnosti NK stanica (146). CD8+T stanice vežu HLA-G, ali se još točno ne zna na koji T stanični receptor (Tcr) (52). Do danas nije nađena ekspresija HLA-G antigena u tkivima odraslih. Taj lokus I. razreda HLA može razviti specijalizirane imunogenetičke funkcije u trudnoći. Raspodjela proteina HLA-G u tkivima nije ograničena samo na ekstravilozni citotrofoblast. Tu su i neke **epitelne stanice medule timusa**, a nađen je HLA-G u **makrofazima posteljice, amnijskoj tekućini i endotelu krvnih žila**

mezenhima jezgre horionskih resica fetusa. Homolozi HLA-G identificirani su u drugim vrstama sisavaca uključujući miša i rhesus majmuna, te se čvrsto pretpostavlja da HLA-G može bitno održavati imunološke i neimunološke funkcije.

Imunološke funkcije vjerojatno su:

- 1) sprečavanje potencijalno štetnog majčinog antipaternalnog imunološkog odgovora, iako je nedavno pretpostavljeno da HLA-G1 izoform možda nije bitan za preživljenje fetusa jer je homozigotna jedinka za null mutaciju u HLA-G gena mogla preživjeti.; ove jedinke, međutim, imaju još potencijal da vrše ekspresiju HLA-G2 izoforma koji mogu zamijeniti deficitni izoform;
- 2) ograničavanje širenja početne infekciju trofoblasta;
- 3) favoriziranje implantacije na početku trudnoće;
- 4) i/ili nadzor invazije trofoblasta u kasnijoj trudnoći.

Neimunološke funkcije

- 1) mogla bi biti povezano s regulacijom angiogeneze resica posteljice.
- 2) HLA-G može utjecati na brzinu dijeljena embrija na isti način kao pre-implantacijski razvojni (Ped) gen u embrija miša (preimplantation embryo development gene), iako HLA-G nema ispravnu nukleotidnu sekvencu da podijeli glycosyl-phosphatidylinositol linkage, niti ima interferon gama suglasnu sekvencu. Ostaje još mnogo neotkrivenog o funkciji HLA molekula Ib. razreda na majčino fetalnom spoju kao i u selekciji u timusu (141).

Postoje neki dokazi da bi oštećenje deaktivacije komplementa na trofoblastu moglo igrati ulogu u habitualnom pobačavanju (156, 157).

Konačni mehanizam koji trofoblast upotrebljava cijelo vrijeme trudnoće da zaštiti sebe od majčine citotoksičnosti je ekspresija visoke razine komplement-regulatornog proteina na svojoj površini, osobito kofaktorski protein membrane (membrane cofactor protein - MCP;CD46) i čimbenika koji ubrzava razgradnju (decay accelerating factor - DAF;CD55).

Uobičajni način kojim imunološki sustav ubija strane stanice ili stanice karcinoma je aktiviranje sustava komplementa. Izvjesni izotipovi protutijela vežu antigene membrana i injiciraju kaskadu komplementa, što vodi skupljanju membrana kompleksa; to stvara rupu u ciljnoj stanici, koja onda brzo umre. Tako, prepoznavanje očevih antigena na površini sinciotrofoblasta može aktivirati niz komplementa, što rezultira smrću stanica trofoblasta. Izvjesne molekule smanjuju ovaj fenomen, ili blokiranjem veznog mjesta komplementa na protutijelu (npr.MCP) ili povećanjem stope razgradnje komplementa (npr.DAF). Ove molekule djeluju sustavno. U posteljici smanjuju mogućnost komplementa da ubije stanice trofoblasta koje nose očeve antigene (146).

Sustav CD95/CD95-ligand (CD95-L) (Fas-Fas ligand) je apoptotički put široko upotrebljavan u imunološkom sustavu tijekom limfopoeze i imunopoeze. Fas je

membranski protein tip I koji pripada obitelji receptora faktora nekroze tumora (TNF), i poznato je da je receptor za FasL citokin, koji također pripada obitelji TNF citokina. Uglavnom djeluje na regulaciju staničnih promjena, eliminaciju stanica tumora, u antivirusnim reakcijama i u zaštiti posebnih tkiva od potencijalnih opasnosti koje predstavljaju uglavnom aktivirani limfociti. Također je aktivan tijekom brisanja klonova autoimunih stanica unutar centralnih i perifernih limfoidnih organa. Uključen je i u citolitički put NK stanica, Th1 stanica i citotoksičnih T stanica. Ova citoliza se odvija istovremeno s produkcijom perforina od strane NK stanica i citotoksičnih T stanica.

Sustav djeluje na sljedeći način: efektorne stanice ekspimiraju CD95-L dok ciljane stanice ekspimiraju CD95. Za zaštitu osobitih tkiva, stanice koje okružuju imunoprivilegirano mjesto ekspimiraju CD95-L. Na primjer, CD95/CD95-L su aktivni u zaštiti izvjesnih dijelova oka dok je CD95-L otkriven je na površini Sertolijevih stanica štakora, a nedavno i unutar ljudskog testisa. Pretpostavka je da stanice trofoblasta ekspimiraju CD95-L i da mogu ubiti aktivirane CD95+ stanice krvi koje dođu u dodir s plodom.

Ligand CD95 sinciciotrofoblasta veže se za CD95 na majčinih imunološkim stanicama, što okida apoptozu imunoloških stanica majke; nasuprot tome, vezanje CD95 na njegov ligand na sinciciotroblastu ne potiče apoptozu sinciciotrofoblasta.

Stanice trofoblasta sintetiziraju CD95-L in vivo i in vitro. Kultivirane stanice trofoblasta mogu inducirati apoptozu T limfocita periferne krvi koji ekspimiraju CD95. Stanice trofoblasta također ekspimiraju CD95, ali to ne uzrokuje njihovu apoptozu već vjerojatno igra ulogu u ograničavanju proliferacije trofoblasta. Samo se dio promatranih apoptoza dešava djelotvorno preko puta CD95/CD95-L. I drugi apoptotički sustav TNF/TNF-R, koji je također prisutna u posteljici, mogao bi biti uključen u toleranciju fetusa.

Osim toga, proteoliza CD95-L na površini stanica, posredovana membranskom metalproteinazom, proizvodi topljivi oblik CD95-L od 26kDa. Ova molekula je biološki aktivna i može također okinuti apoptozu bliskih imunih stanica ili onih koje dolaze u dodir s fetalnim stanicama (146).

Već je odavno poznato da se na stanicama trofoblasta nalaze naslage fibrinoidnog materijala poznatog pod nazivom Nitabuchov sloj. Taj fibrinoidni materijal sadrži velike količine sulfata sijalinske kiseline. To je deblji što je veća antigen-ska razlika između majke i fetusa. Sijalinska kiselina čini 1 do 3% težine stanice trofoblasta, što je neuobičajeno visoka razina, kakvu nema nijedna druga stanica u organizmu. Osim toga sijalinska kiselina daje stanicama trofoblasta vrlo veliki negativni naboj. Poznato je da upravo elektrostatski naboj znatno utječe na stanične interakcije, pa je logično pretpostaviti da će takva struktura sprečavati ili izrazito otežavati intimni kontakt majčinih limfocita, koji su također elektronegativni, i stanica trofoblasta. Te tako otežati odnosno onemogućiti prepoznavanje fetalnih antigena.

Antitrofoblastna protutijela i trofoblastni antigeni nisu definitivno okarakterizirani. Antitrofoblastna protutijela su imunoglobulini majke klase IgM i IgG usmjereni protiv fetalnih trofoblastnih antigena i mogu utjecati na formaciju blastocista/trofoblast. Koncentracija protutijela smanjuje se tijekom sljedećih trudnoća (158). Ne postoji suglasnost s obzirom na subpopulaciju trofoblasta koja služi kao antigen.

Trofoblastni antigeni koji križno reagiraju s limfocitima (TLX antigen) su polimorfni antigenski sustav koji na svojoj površini ekspimiraju stanice fetalnog trofoblasta i majčine imunokompetentne stanice (159,160). Privukao je pozornost reproduktivnih imunologa kao potencijalni imunoregulator. Nađeno je da je TLX antigen identičan CD46; neki smatraju da je to polimorfni antigen na sinciotrofoblastu R80K (161).

Njegova jaka ekspresija na svim trofoblastnim stanicama štiti te stanice od komplement posredovanog oštećenja, koje nastaje zbog napada majčinih protutijela ili lokalnog tkivnog resktrukturiranja i izmijenjene hemostaze, koji mogu podupirati stalnu nisku razinu aktiviranog komplementa. Ljudska protutijela za R80K suprimiraju citotoksičnost NK. Prema tome uspješna trudnoća traži vezanje IgG na R80K, istraživane su samo terminske posteljice i daljnja istraživanja su potrebna da se odredi važnost R80K u ranoj trudnoći. Tijekom normalne trudnoće antiTLX protutijela vežu se na TLX antigene trofoblasta. Ta protutijela mogu se eluirati s posteljice, in vitro blokiraju reakciju majčinih limfocita usmjerenu na limfocite roditeljskog partnera. TLX antigeni potiču novačenje supresorskih stanica u uterus (140). U ranijim istraživanjima iz uzoraka seruma nisu odstranjena druga protutijela kao na primjer antifosfolipidna protutijela. Tedesco i suradnici ukazuju na prisutnost antitrofoblastnih protutijela u žena s klinički definiranim rekurentnim spontanim pobačajem (RSA) (162).

U krvi trudnica nađeni su mnogi imunoregulacijski faktori. Trofoblast proizvodi nekoliko nespecifičnih imunosupresijskih faktora kojih je svrha također supresija majčinoga imunološkog odgovora na očeve antigene prisutne na stanicama fetusa. Njihova uloga u trudnoći još nije razjašnjena.

Progesteron, estrogeni-estradiol, alfa 2 glikoprotein udružen sa trudnoćom, HCG, HPL i humani horionski somatotropin, alfa fetoprotein, PAPP-C djeluju imunosupresijski sistemski samo u superfiziološkim koncentracijama u serumu. Prema tome njihovo imunosupresijsko djelovanje vjerojatno se očituje na površini trofoblasta. Brojni hormoni i citokini prisutni su i djeluju u posteljici. Oni djeluju na tkivo trofoblasta na mnogo načina i neki od njih moduliraju imunološke funkcije.

Postojanje i uloga supresijskih stanica tijekom trudnoće su kontroverzni (163). Supresijske stanice vjerojatno suprimiraju majčin imunološki sustav i njihova deficijencija dovodi do fetalnog gubitka. Ne postoji konsensus s obzirom na izvor i prirodu supresijskih stanica, iako one mogu uključivati T stanice specifične za stanice trofoblasta, endometrijske/decidualne čimbenike, steroidne hormone ili nespecifične bjelančevine i glikoproteine (164). Supresijske stanice identificiraju se svojim sekrecijskim proizvodima, kao što su IL-2, blokirajući čimbenici, prostaglandin E₂ ili TGF-β₂ (165). Supresijska aktivnost u ljudi ocjenjuje se upotrebom nepročišćenih posteljičnih ekstrakata, kultiviranjem supernatanta posteljičnih ekstrakata, kultiviranjem supernatanta koriokarcinoma i linija teratokarcinoma (166). Supresijske stanice decidue u 50% žena s RSA smanjeno stvaraju TGF-β₂ (165).

U decidui, populacija malih limfatičkih stanica koje, vjeruje se nisu T ni B stanice, stimulirana trofoblastom proizvodi imunosupresijske faktore. Aktivnost

ovih stanica visoka je u uspješnim trudnoćama. One oslobađaju imunosupresijske molekule TGF- β 2 (transformirajući faktor rasta beta 2).

Dok je stopa pobačaja povećana kao odgovor na primjenu antiTGF- β protutijela. Također novi TJ6, supresorski protein kojeg stvara decidua i timus, može imati važnu ulogu u prevenciji neuspješnih trudnoća.

Iako i TJ6 i TGF- β 2 proizvodi decidua, izgleda da su ove dvije molekule različite. TGF- β 2 molekule detektabilne su samo nakon implantacije, dok je TJ6 protein prisutan ranije. Možda su ove dva faktora različita ali imaju komplementarnu ulogu u osiguranju uspješne trudnoće. Tako je TJ6 važan u ranoj trudnoći budući da olakšava placentaciju, sprečavajući citolizu trofoblasta NK stanicama. Održavanje daljnje vijabilnosti i otpornosti na štetno djelovanje NK stanica osiguravaju TGF- β 2 koje luče decidualne supresijske stanice (167).

Važna molekula je **progesteron** kojeg posteljica sintetizira u velikoj količini. Kadar je sniziti imunološki odgovor. Opisano je točno djelovanje ovog hormona na toleranciju fetusa.

U trudnoći dolazi do aktivacije progesteronskih receptora na površini CD8+ T limfocita. Ove stanice stimulirane progesteronom luče čimbenik od 34-kDa koji suprimira citolitičku aktivnost NK stanica. Tako neodgovarajuća produkcija progesterona može dovesti do neodgovarajuće supresije citolitičke aktivnosti NK stanica što može rezultirati pobačajem (167). Progesteron potiče sintezu LIF-a u endometriju i pomiče Th1/Th2 ravnotežu prema TH2.

Progesteron međutim nije jedini hormon koji djeluje na imunološki sustav.

Hormon rasta nekih vrsta glodavaca također utječe nedvojbeno na funkcioniranje imunološkog sustava. Ljudska posteljica sintetizira posebni hormon rasta, humani posteljični hormon rasta (hPGH), koji se razlikuje u samo 13 amino kiselina od pituitarnog hormona rasta (hGH-N); hPGH zamjenjuje u krvi majke hGH-N tijekom druge polovice trudnoće. hPGH se obilno stvara tijekom trudnoće i može igrati aktivnu ulogu u fetoplacentnoj toleranciji djelujući na majčin imunološki sustav. Jednako je djelovanje hGH-N i hPGH na proliferaciju stanica i produkciju citokina pokazano je pokusima u kojima su hGH-N ili hPGH uvedeni u fiziološkim koncentracijama u kulture medija limfoidnih stanica (146).

Endometrijska stanica sintetizira i luči hidrosolubilnu molekulu koja se zove faktor inhibicije leukemije (LIF), prateći menstrualni ciklus progesterona, s najvećom ekspresijom između 19. i 25. dana menstrualnog ciklusa (168). LIF vodi diferencijaciju ljudskog trofoblasta prema adhezivnom fenotipu potrebnom za implantaciju (169,170). LIF uređuje međusobna djelovanja između majčinih decidualnih leukocita i blastociste tijekom implantacije budući da invadirajući ekstrasvilozni trofoblast eksprimira LIF-R, te potiče ekspresiju LIF mRNA u decidualnih leukocita (171). Epitel endometrija, stanice strome i stanice decidue luče LIF. Tijekom trudnoće decidua i Th2 limfociti sintetiziraju LIF, dok sinciotrofoblast eksprimira LIF-R. Točna funkcija LIF/LIF-R molekula tijekom trudnoće još je nepoznata. Vezanjem LIF-a na njegov receptor vjerojatno se potiče rast i diferencijacija trofoblasta. Ovaj mehanizam je također usko povezan

s drugim imunološkim mehanizmima uključenim u feto-maternalnu toleranciju, kao što su Th1/Th2 balans i regulacija progesteronom (146).

Fertilne žene tijekom implantacije i sekrecijske faze ciklusa izlučuju veće koncentracije LIF nego žene s reproduktivnim neuspjehom (168, 172).

Iako važnost LIF tijekom razvoja gameta, i ranog embrija ostaje kontroverzna, ekspresija LIF je bitna za razvoj blastociste i implantaciju u ljudi.

LIF inhibira sekreciju metalproteinaze, povećava odlaganje fetalnog fibronektina u izvanstanični matriks i inhibira diferencijaciju citotrofoblasta u sincicium (169).

Promjene u ekspresiji LIF ljudskog endometrija udružene su s reproduktivnim neuspjehom tijekom perioda implantacije.

In vivo studije koncentracije LIF-a, mjerenjem ispirka materišta fertilnih i infertilnih žena i žena s ponavljanim pobačajima, našle su smanjenu koncentraciju LIF-a u žena s neobjašnjenim infertilitetom (173).

Daljnje studije su potrebne da razjasne uzajamno djelovanje LIF majke-fetusa tijekom rane reproduktivne faze razvoja (14).

Adhezijske molekule reguliraju uzajamno djelovanje između stanica i tkivnog matriksa. Endometrijski čimbenici adhezije reguliraju uzajamno djelovanje između stanica trofoblasta/blastociste i endometrija tijekom implantacije. Integrini, kompleks trofinin-tastin, CD44 i cadherin-11 su endometrijski čimbenici adhezije utvrđeni na majčino-fetalnom spoju tijekom implantacije (174). Trofinin i tastin otkriveni su na trofoblastu i epitelnim stanicama endometrija, stvaraju kompleks adhezijskih stanica koji regulira implantaciju (175). Osim toga, ekspresija trofinina i tastina odigrava se u ljudskom endometriju 16/17 dan, u ranoj sekrecijskoj fazi menstrualnog ciklusa (176). Integrini su velika obitelj molekula, transmembranskih receptora sastavljenih od nekovalentno povezanih alfa i beta podjedinica, koje usmjeravaju stanice u tijeku diferencijacije, povezuju stanice međusobno i s izvanstaničnim matriksom (177). Većina stanica, te spermij i oocita, uključujući i sve limfocite T nose integrine (178).

U ljudi integrini su važni tijekom fertilizacije, implantacije i razvoja posteljice. Specifični integrini i/ili promijenjena ekspresija integrina kontroliraju brzinu migracije blastociste i invaziju decidue (179,180).

Reproduktivski neuspjeh u ljudi povezan je s nedostatnom promjenom profila te zakašnjelom ekspresijom integrina trofoblasta (181,182,183).

Druge adhezijske molekule CEACAM1/CD66a/C-CAM/BGP, pripadaju obitelji karcinoembrionskih antigena (carcinoembryonic antigen), izražavaju se na površini endometrija i žljezdanom epitelu. Iako odsutan na decidualnim stanicama, CEACAM1 je otkriven na endometrijskom epitelu, malim endometrijskim krvnim žilama, ekstraviloznim stanicama trofoblasta. I drugi čimbenici mogu također pokazivati adhezivna svojstva za vrijeme trudnoće, kao krvne grupe H tip I, antigen Lewis, lecitin i heparin sulfat (174).

Veliki utjecaj na receptivnost endometrija ima ekspresija antiadhezijskih molekula mucina u endometriju ili decidui.

Mucini su skupina velikih glikoproteina koji oblikuju sluz u respiratornom, gastrointestinalnom i urogenitalnom traktu (184). Služe kao podmazivači i protektori bazalnih epitelnih stanica (185).

MUC1, poznat kao Muc-1gen u drugih vrsta, hormonski je regulirani proizvod endometrijskih žlijezda i luminalnog epitela. Visoka ekspresija MUC1 sprečava implantaciju blastocista u primata. U ljudi i drugih sisavaca embriji signaliziraju epitelu maternice da smanji ekspresiju mucina, omogućavajući implantaciju.

Ako MUC1 inhibira implantaciju, smanjena koncentracija MUC1 u žena s reproduktivnim neuspjehom dopušta implantaciju embrija slabije vijabilnosti. Međutim, u fertilnih žena, viša koncentracija MUC1 za vrijeme implantacije nudi povolju priliku za prenatalnu selekciju (prenatalni izbor) (186).

Pretpostavlja se da ekspresija MUC1 djeluje kao majčin selekcijski mehanizam za vijabilni embrij (187,188).

Žene s poviješću reproduktivnog neuspjeha pokazuju nižu koncentraciju MUC1 za vrijeme imlantacije u usporedbi s fertilnim ženama (189,190). Oni mogu također utjecati na pristup spermija do oocyte u reproduktivnom traktu majke (186). Ekspresija MUC1 u endometriju može imati presudnu ulogu tijekom implantacije, a aberantna, ili nedostatna ekspresija mucina, vodi reproduktivnom neuspjehu.

Aneksin II je član obitelji glikoproteina koji vežu negativno nabijene fosfolipide u kalcijum ovisnom okružju. Aneksini su membranski vezani proteini koje eksprimiraju i normalne, i maligne stanice, a može ih lučiti posteljica. Nedavno je pokazano da aneksin II može djelomično inhibirati imune stanice majke. Tako ove molekule mogu biti uključene u zaštitu fetusa protiv imunološkog sustava majke. Moguća je uloga aneksina II u toleraciji fetusa. Anexin II sinciotrofoblasta inhibira funkciju majčinih limfocita, na primjer sekreciju IgG i proliferaciju stanica, nakon vezanja za negativno nabijene fosfolipide (146)

Majčin imunološki sustav aktivno prepoznaje fetalni alograft, a to dovodi do stvaranja zaštitnih faktora putem staničnog odgovora i stvaranjem zaštitnih protutijela i citokina. I majčine i fetalne stanice uključene su u sekreciju citokina. S majčine strane uključeni su brojni makrofagi, veliki granulirani limfociti, stanice decidue i strome isto kao i T stanice koje infiltriraju posteljicu i deciduu, a s fetalne strane makrofagi, ili Hofbaurove stanice i stranice trofoblasta. (130)

Citokini su niskomolekularni glikoproteini (15-25kDa) koji posreduju djelovanje jedne stanice na drugu (**intercelularna komunikacija**). Luče ih mnogobrojne stanice u organizmu, ali većinom imunološke i upalne stanice. Djeluju na same imunološke i upalne stanice, na hematopetske stanice, ali i na različite druge stanice, kao što su fibroblasti, hepatociti i keratinociti (**parakrino djelovanje**), ali katkada djeluju na iste stanice koje ih luče (**autokrino djelovanje**). Luče se i djeluju lokalno, djelatnost im brzo nestaje (poluvijek života im je nekoliko minuta) pa ih mnogi smatraju lokalnim hormonima. Međutim u nekim stanjima, kao što su bakterijske sepse i prošireni maligni tumori, luče se u velikim količinama te se »prelijevaju» u cirkulaciju i djeluju na udaljena tkiva (endokrino djelovanje). Citokini imaju brojne biološke učinke: djeluju na procese aktivacije, proliferacije (rasta) i diferencijacije stanica, potiču u stanicama nove funkcije, posreduju ili reguliraju imunološke reakcije, djeluju kemotaksijski i reguliraju upalne procese. Drugi pak inhibiraju rast stanica ili

djeluju citotoksično. Na taj način citokini sudjeluju u procesima homeostaze (112). U najširem kontekstu obitelj citokina obuhvaća ne samo bjelančevine koje izlučuju izvorno opisane populacije imunololoških i upalnih stanica, već također i bezbrojne faktore rasta, onkogene, kemokine i druge topljive čimbenke koji djeluju na rast, diferencijaciju i vijabilnost stanica parakrinim, autokrinim i jukstakrinim načinom preko vezanja na njihove membranski vezane receptore (191).

Po ovim brojnim učincima citokini se razlikuju od faktora rasta koji uglavnom djeluju na rast stanica. U novije vrijeme otkriveni su citokini znatno manje molekularne mase od klasičnih citokina, a glavno im je djelovanje kemotaksija. Ti citokini nazvani su kemokini (prema engl. Chemotactic cytokine).

Limfokini su izraz za citokine koje luče limfociti, a monokini su citokini koje luče monociti-makrofazi.

Izraz interleukin rabio se primarno za citokine (limfokine) koje luči jedna vrsta leukocita a djeluju na dugu vrstu leukocita. U današnje vrijeme izraz interleukin rabi se za leukocitne citokine kojih je građa (redosljed aminokiselina) poznata i koji se mogu proizvesti u čistom obliku metodama rekombinantne DNA-tehnologije (112).

U novije vrijeme citokini se svrstavaju u podskupine prema građi i mehanizmu djelovanja njihovih receptora. Tako se citokini dijele u nekoliko «obitelji»: obitelj IL-2 (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15), obitelj IL-6 (IL-6, IL-11 i LIF), obitelj hematopetina (GM-CSF, IL-3, IL-5, eritropoetin, obitelj s receptorom poput imunoglobulina (ILK-1, M-CSF), obitelj TNF (TNF α , TNF β , CD40L, FasL) i interferonska obitelj (svi interferoni) (112). Za djelovanje mnogih citokina svojstven je pleotropizam, tj. da jedan te isti citokin djeluje na nekoliko vrsta stanica i ima više različitih učinaka. Za citokine također je karakteristična redundacija, tj. da isto djelovanje na istu stanicu može imati nekoliko citokina odnosno da se djelovanje različitih citokina dobrim dijelom preklapaju. Unatoč redundaciji spektar djelovanja pojedinog citokina jest jedinstven. Receptor većine citokina građen je najmanje od dvaju polipeptidnih lanaca (podjedinice), od kojih je samo jedan specifičan (za nj se veže citokin), a drugi je nespecifičan (prenosi signal u stanicu). Različiti citokini koriste se istom nespecifičnom, transdukcijском podjedinicom koja je prisutna u mnogim stanicama (112). Ovi solubilni receptori opisani su u mnogim tjelesnim izlučevinama (u serumu, plazmi, urinu, i različitim kulturama stanica ovisnim o sredini-mediju i uključuju IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, LIF, G-CSF, M-CSF, GM-CSF-čimbenik koji stimulira granulocitne-makrofagne kolonije i TNF- α isto kao i EGF i PDGF) gdje oni mogu poslužiti za nekoliko funkcija. Jedna takva funkcija je zaštita liganda od proteolize. Oni također mogu poslužiti u za transport ili djelovati kao rezervoar koji zadržava citokine u pohrani sve dok su oni prisutni na površinskim receptorima. Tako se omogućava djelovanje citokina. Solubilni citokinski receptori mogu također djelovati kao antagonisti kompeticijom s vezanjem liganda za površinske receptore (112,191).

Biološka aktivnost u nekom uzorku ili pripravku obično se testira biotestom. Mjeri se učinak citokina na aktivaciju, proliferaciju ili citotoksičnost osjetljivih stanica. U najnovije vrijeme, nakon izolacije čistih molekula i dobivanja visokospecifičnih monoklonskih protutijela, razina limfokina određuje se imunokemijskim metodama (radioimunotest ili enzimoimunotest). Sličnim se

metodama nastoji odrediti prisutnost receptora na stanicama ili u serumu za pojedine citokine (112). Interleukini (IL), kao što je već spomenuo, dobili su ime po tome što ih luče leukociti i djeluju na leukocite. No danas se zna da interleukine mogu lučiti i druge stanice te da interleukini djeluju na neleukocitne stanice (npr. Fibroblasti, endotelne stanice, osteoblasti itd.). Poznato je više od 18 interleukina, a dobro su poznata svojstva 12-13 interleukina. Samo tri ili četiri interleukina luče monociti-makrofagi, a sve ostale luče uglavnom limfociti T.

Interleukin-2 nazivao se i hormon rasta limfocita T (TCGF, prema engl. T cell growth factor) jer omogućuje dugotrajan rast (proliferaciju) stimuliranih limfocita T in vitro. Gen za IL-2 je single-copy gen koji sadrži 4 exona i smješten je na 4. kromosomu -4q26-27. IL-2 je glikoprotein. Nezrel protein sastoji se od 153 aminokiseline. Tijekom sazrijevanja čisti se prvih 20 aminokiselina, što rezultira zreli proteinom od 133 aminokiseline s pretpostavljenom molekularnom težinom od 15,4kD. Zbog varijacije u profilu glikozilacije, molekularna težina može varirati između 15 i 20 kD. Glikolizacija nema utjecaja na biološku aktivnost ali je izgleda važna za eliminaciju-odstranjenje putem hepatocita Tijekom sazrijevanja IL-2, što ga luče aktivirani pomagački limfociti, ne djeluje na neaktivne, djevičanske limfocite T jer oni ne izražavaju receptor za IL-2; tek limfociti stimulirani antigenom ili mitogenom izražavaju taj receptor i proliferiraju u prisutnosti IL-2. To djelovanje IL-2 osobito je važno za sazrijevanje citotoksičnih limfocita T, a koristi se za dugotrajno uzgajanje linija (klonova) limfocita in vitro. IL-2 uzrokuje proliferaciju i povećava citotoksičnost stanica NK i manjeg dijela neaktiviranih limfocita T. Za razliku od limfocita T, stanice NK imaju u mirovanju izražen receptor IL-2 (lanac β). Pod utjecajem IL-2, te stanice postaju nespecifično citotoksične za mnoge tumorske stanice i nazivaju se LAK (prema eng. Lymphokine activated killers). IL-2 djeluje i kao kofaktor u sazrijevanju aktiviranih limfocita B (112).

Dva najvažnija citoksina: faktor tumora nekroze (TNF) i limfotoksin (LT) kodiraju geni unutar HLA sustava pa imaju sličnu građu i djelovanje. Gen za h-TNF- α je jedna kopija gena dužine približno 3,6kb, sastojio se od 4 exona i mapiran je na 6. kromosomu 6p23-6q12, veoma blizu nalazi se i gen za h-TNF- β . h-TNF- α je ne-glikolizirana bjelančevina od 17kD, dužine 157 aminokiselina. Oblik TNF od 17 kD je pročišćeni intracelularni prekursor bjelančevine od 26 kD, koja sadrži dodatne N-terminalne propeptidne sekvence od 76 aminokiselina koje su usidrene molekule prekursora u staničnoj membrani. Međutim, proizvode ih različite stanice: TNF proizvode u prvom redu monociti-makrofagi, a LT citotoksični limfociti T. Zbog sličnosti građe i djelovanja predloženi su i slični nazivi za ta dva limfokina: TNF α i TNF β za TNF odnosno LT. Mehanizam kojim ti limfokini ubijaju ciljnu stanicu temelji se na cijepanju (fragmentaciji) DNA u stanici.

Faktor nekroze tumora (TNF α) dokazan je najprije u serumu životinja kojima je uštrcan endotoksin (lipopolisaharid iz stijenki gram-negativnih bakterija). Pokazalo se da taj faktor, a ne endotoksin, izaziva, hemoragičnu nekrozu, a katkada i potpunu regresiju malignih tumora in vivo. Međutim, sam TNF α ubija vrlo malo tumorskih stanica in vitro pa se misli da je njegov protutumorski učinak in vivo indirektan, tj. da je posljedica njegovih imunomodulacijskih učinaka. Doista, zamijećeno je da TNF α ima čitav niz takvih učinaka, npr.

povećanje izražavanja antigena HLA II. razreda (osobito na endotnim stanicama kapilara) i receptora za IL-2 na limfocitima, indukcija citotoksičnih limfocita, aktivacija neutrofilnih leukocita i pojačanje sekrecije drugih citokina pa je teško odrediti koji je osnovni mehanizam djelovanja TNF α .

Osim toga, TNF α ima čitav niz neželjenih djelovanja koja ograničavaju njegovu sistemsku primjenu. TNF α inhibira sintezu lipoproteinske lipaze, a uzrokuje lipemiju, anoreksiju, i kaheksiju pri uznapredovalim infekcijama i zloćudnim tumorima (otud i drugo ime TNF α ; kahektin). Nadalje, izaziva sliku endotoksičkog šoka i inhibira rast eritropoetskih i mijelopoetskih kolonija. Ima slična proupalna djelovanja kao IL-1 pa se svrstava među proupalne citokine. Citokini normalno djeluju lokalno jer se luče u malim količinama i zato što djeluju različiti inhibitori njihova djelovanja. Kao inhibitori koji koče sistemsko djelovanje citokina najčešće djeluju antagonisti receptora (vežu se na receptor citokina, a ne izazivaju biološki učinak-kompetitivnu inhibiciju, npr. antagonist receptora za IL-1) i slobodni receptor u serumu blokiraju djelovanje citokina (topljivi dijelovi receptora «otkinuti» sa staničnih membrana ciljnih stanica). U slučajevima kada se luče velike količine citokina, citokini se »prelijevaju» u cirkulaciju i mogu imati neželjene učinke. Nadalje, obično se usporedno i nakon lučenja citokina luče glukokortikoidi koji koče proizvodnju ili djelovanje limfokina (112,192). TNF- α prisutan je u serumu žena podvrgnutim postupku IVF u rasponu koncentracije od 84 do 920 pg/ml (193).

Citokini također imaju mnoge učinke na reprodukciju i uključeni su u razvoj gameta (193,194), implantaciju, invaziju trofoblasta, decidualizaciju, razvoj posteljice i imunotoleraciju trudnoće (195,196). Općenito, Th1 citokini mogu oštetiti posteljni trofoblast ili imati štetna djelovanja na zametak, izravnim embriotoksičkim djelovanjem (196). Th2 citokini sprečavaju majčin Th1 odgovor protiv zametka (197).

Različite vrste stanica izlučuju citokine kao odgovor na infekciju, uključujući infekciju na majčino-fetalnom spoju. Najranija istraživana citokina usmjerila su se na lučenje citokina iz limfocita T.

Pomagački limfociti T (Th) sastoje se od dvije podvrste stanica, koje se razlikuju po funkciji i lučenju pojedinih citokina. Izvorno, ove dvije vrste, Th1 i Th2, klasificirane su in vitro upotrebom bioeseja i ELISA, nijedna subpopulacija nema specifičnog biljega, nego se prepoznaju po vrsti limfokina koje luče nakon kontakta s antigenom ili nespecifičnim aktivatorima limfocita.

Th1 stanice luče citokine interleukin-2 (IL-2), limfotoksin (TNF- β) i interferon γ (IFN- γ), a Th2 stanice luče IL-4, IL-5, IL-10. Obe Th1 i Th2 stanice luče IL-3, IL-6, IL-12, IL-13, TNF- α , GM-CSF, enkefalin i kemokine citokine. Th1 proizvode nešto više IL-2 i faktora nekroze tumora-alfa (TNF α) nego TH2, dok obje subpopulacije luče podjednake količine IL-3, IL-7 i GM-CSF (112). Općenito, Th1 i Th2 citokini induciraju različite učinke. Th1 citokini proizvode citotoksične i upalne reakcije, posreduju reakcije kasne preosjetljivosti (DTH-delayed-type hypersensitivity) i proizvode ozljede tkiva u infekciji i autoimunim bolestima. Th2 citokini potiču proizvodnju protutijela (gensko prekapčanje, dozrijevanje afiniteta protutijela), osobito IgE reakcije, i povećavaju proliferaciju i funkciju eozinofila (198). Vrlo je važno zapažanje da limfokini jedne podvrste stanica Th stimuliraju rast stanica što ih proizvode, a inhibiraju rast druge podvrste stanica (112). Stoga, relativna učestalost ovih antagonističkih

citokinskih podvrsta određuju da li je imunološki odgovor zaštitni ili patološki (111, 198).

Citokini mogu ovisno o tipu i koncentraciji citokina koji se luči te stupnju diferencijacije ciljnog tkiva, izravno ili neizravno, interferirati s reproduktivnim događanjima (111).

Wegmann i suradnici postavili su postulat da je trudnoća ravnoteža između aktivnosti Th1 i Th2 citokina. Preživljenje fetusa bilo poboljšano ako su Th1 reakcije inhibirane s Th2 citokinima (110). Prirodna posljedica iz već dokazanih zaključaka ove hipoteze je da djelovanja Th1-tipa citokina dovodi do fetalnog gubitka (197) i da deficit osobitih citokina važnih za trudnoću dovodi do redukcije razvoja posteljice, subnormanog fetalnog rasta ili čak do fetalne smrti (195, 196). Iako su mjerene koncentracije citokina tijekom ljudske trudnoće, njihovi specifični učinci na trudnoću određeni su proučavanjem drugih vrsta. Kompleksan profil Th1/Th2 je otkriven u ljudi i ne postoji suglasnost da se preusmjerenje imunološke reakcije od Th1 u Th2 događa tijekom ljudske trudnoće. Iako izravni uzročni odnos između proizvodnje ljudskih citokina i gubitka trudnoće nije nađen, razlike u aktivnosti citokina nađene su u fertilnih žena i onih s iskustvom reproduktivskog neuspjeha.

Tranchot-Diallo i suradnici nisu otkrili "klasične" Th2 profile u trudnica (199) nasuprot toga, Reinhard i suradnici našli su su povećanje Th2 citokina (IL-4) i smanjenje Th1 citokina (IFN- γ i IL-2) za vrijeme, i uskoro nakon, normalne trudnoće (200).

Ne postoje slaganja s obzirom na skretanje citokina u žena s RSA.

Schust i Hill nisu našli udruženost između ishoda trudnoće u žena s RSA i nivoa serumskih Th1 (IL2, IFN- γ , TNF- α) i Th2 (IL10) citokina i topive intracelularne adhezijske molekule-1 (sICAM-1) (201).

Mallman nije našao razliku u nivou IL-2 u serumu trudnih i netrudnih žena.

U žena s ponavljajućim pobačajima našao je značajno povećanje TNF- α te smanjenje IL-2 u serumu u usporedbi s ženama s urednom trudnoćom (202).

Shaarawy i suradnici uzimali su krv trudnicama, sa znakovima krvarenja i bolovima u prvom tromjesječju i to u dvije skupine trudnica: s prethodno 3 uzastopna spontana pobačaja i sada dokazanim odumrlim embrijem, urednog kariotipa, i druga skupina trudnica kojoj je ovo prva neuspjela trudnoća uzrokovana abnormalnošću kromosoma. Određivali su razinu citokina IL-1 β , TNF- α IFN- γ , neopterin u serumu. Krv su uzimali neposredno prije evakuacije trudnoće. Koncentracija TNF- α u serumu u habitualnih pobacilja bila je značajno viša nego u kontrolnoj skupini. Srednja vrijednost koncentracije TNF- α je 14.2 ± 1.73 pg/ml u kontrolnoj skupini, a $25,95 \pm 2.12$ pg/ml u habitualnih pobacilja (203).

U kasnijem izvještaju Hill nije potvrdio prediktivnu vrijednost za ishod trudnoće nivoa TNF i IL-2.

Pokušao je dati objašnjenje za to: »Jedan od mogućih razloga za ovu diskrepancu može biti što su u našoj studiji, uzorci seruma dobiveni nakon potvrđene srčane akcije fetusa te kasnije korelirani s ishodom naredne trudnoće, dok naprotiv u studiji koja izvještava da su razina serumskog TNF i IL-2 povezani s gubitkom

trudnoće, istraživači nisu naveli da li su fetusi bili živi ili mrtvi u vrijeme dobivanja seruma. To je potencijalno važno jer u slučajevima missed abortiona gdje je fetus već mrtav, nije iznenađujuće naći povišenje upalnih citokina. Istovremeno, procjena embriotoksičnosti majčinog seruma u sustavima mišje kulture nije također značajno vrijedna sve dok nije izvršena inaktivacija toplinom da razori komplement i preapsorpcija mišjim splenocitima da odstrane heterofilna protutijela. Osobitu pažnju je također potrebno usmjeriti na epruvete za sakupljanje seruma jer je gumeni čep epruveta vakuumtajnera embriotoksičan» (196).

Palfi i suradnici određivali su IFN γ i IL-4 u serumu žena habitualnih pobacilja. Uzorak su uzimali prije trudnoće i u trudnoći između 7-10 i 17 –20 tjedna i nako trudnoće. Nisu našli pomak Th1 (IFN- γ) prema Th2 (IL-4) tijekom trudnoće u žena s RSA. Našli su značajno veću razinu IFN- γ i IL-4 u 17-20 tjednu trudnoće, u odnosu na prvo tromjesečje i prije trudnoće i nakon poroda u žena habitualnih pobacilja. Razina citokina bila je značajno viša u netrudnih žena habitualnih pobacilja u odnosu na kontrolu (204).

Međutim, Reinhard i suradnici u žena s RSA našli su preusmjerenje prema Th1 imunosti (199).

MacLean i suradnici određivali su koncentraciju IL-2 receptora u serumu ne trudnih žena, zdravih trudnica u prvom tromjesečju, trudnih žena s anamnezom habitualnog pobacivanja čija je trudnoća završila kasnije neuspješno u prvom tromjesečju i u onih habitualnih pobacilja čija se trudnoća uspješno razvijala nakon prvog tromjesečja. Koncentracija IL-R bila je značajno viša u habitualnih pobacilja u odnosu na netrudne žene i zdrave trudnice. Pri uzimanju drugog uzorka izgubila se razlika u koncentraciji IL-2 receptora između zdravih trudnica i habitualnih pobacilja koje su uspješno nastavile trudnoću nakon prvog tromjesečja. Ovo povećanje zabilježeno je u ranom prvom tromjesečju kad su sve trudnice imale vijabilan plod.

Nalaz ukazuje da u habitualnih pobacilja ne postoji barem inicijalna depresija imunosupresijskih čimbenika, ali nije jasno koji je okidač u padu IL-2 receptora u žena čija je trudnoća bila uspješna. IL-2 receptor poznat je kao osjetljivi i kvantitativni marker aktivacije i proliferacije T stanica (205).

Na nesreću, većina studija koristi samo jedan ili dva citokina kao značajku za Th1 i Th2 odgovor, stoga je podcijenjena složenost skretanja citokina. Potrebne su daljnje studije promjene citokina, osobito u posteljičnom tkivu, da pokažu da li su skretanja TH1/Th2 važni za ljudsku trudnoću.

Iako preusmjerenja citokina nisu proučavana ekstenzivno u reproduktivskom tkivu, koncentracije citokina u žena ispitivane su u endometriju/decidui, fetalnim tkivima i korionskim resicama (206, 207, 208, 209).

Th1 citokini, IFN- γ i TNF- α inhibiraju *in vitro* proliferaciju stanica ljudskog trofoblasta. (210).

Antigeni ljudskog trofoblasta *in vitro* potiču mononuklearne stanice periferne krvi žena s RSA da proizvode topljive faktore i Th1 citokine toksične za mišje embrije i stanične linije ljudskog trofoblasta (111, 211). Studije su također istraživale utjecaj na reproduktivski ishod lučenja citokina mononuklearnih stanica periferne krvi. Tijekom trudnoće, mononuklearne stanice periferne krvi povećavaju proizvodnju progesterona u žutom tijelu, olakšavajući i podržavajući, implantaciju embrija. Mononuklearne stanice periferne krvi kookultivirane sa

stanicama žutog tijela izlučuju Th2 citokine IL-4 i IL10 i stimuliraju daljnju proizvodnju progesterona (212).

Mononuklearne stanice periferne krvi stimulirane *in vitro* trofoblastnim antigenima proizvode visoku koncentraciju IFN- γ i TNF- β (Th1) te nisku koncentraciju IL-4 i IL-10 (Th2). Mononuklearne stanice periferne krvi žena s poviješću uspješnih trudnoća izlučuju značajno višu koncentraciju IL-6 i IL-10 (Th2) i niže koncentracije IFN- γ u usporedbi s mononuklearnim stanicama periferne krvi žena s RSA (111, 213). Isti autor prospektivno je analizirao sekreciju citokina mononuklearnih stanica periferne krvi u žena tijekom prvog tromjesečja trudnoće. Trudnice s poviješću uspješnih trudnoća (n=24) izlučivale su značajno višu koncentraciju Th2 citokina i nižu koncentraciju Th1 citokina u usporedbi s trudnicama koje su habitualno pobačivale (n=23) (214). Ova istraživanja ukazuju na važnost citokina tijekom svih razdoblja trudnoće.

Žene koje proizvode visoke koncentracije Th1 citokina možda su nesposobne postići odgovarajući Th2 odgovor na fetalne antigene, reakciju koja bi normalno umanjila Th1 odgovor i prevenirala gubitak trudnoće.

Međutim, u ljudi nije još dokazan izravni uzročni međuodnos između stvaranja citokina i gubitka trudnoća.

Iako ljudske studije pokazuju da citokini imaju jedinstveno i važno djelovanje na trudnoću, izazov je izbor dviju isključivih pomagačkih T staničnih podvrsta. Mnogi klonovi T stanica ne pristaju Th1/Th2 klasifikaciji (215).

Kao drugo, Th1 i Th2 stanice luče tijekom razvoja različite podvrste citokina, i mogu posredovati naizmjenične učinke tijekom trudnoće (197). Konačno, klasificiranje citokinskog odgovora s Th1 i Th2 stanicama može biti zabluda (216), budući da mnoge druge stanice proizvode citokine, uključujući $\gamma\delta$ T stanice, CD8+ stanice, NK stanice, mastocite, B stanice, bazofile, makrofage i keratinocite (198).

Fetalni antigeni budu predstavljeni majčinom imunološkom sustavu i pobuđuju kod njega prvo reakciju odbacivanja, koja je uvijek uspješna, osim ako se ne spriječi drugim zaštitnim imunološkim odgovorom.

Postoji mnoštvo dokaza da se tzv. blokirajuća protutijela (oslabljuju jakost limfocitnog odgovora *in vitro*) mogu naći u serumu trudnica i posteljičnim eluatima.

U njih spadaju antiHLA i antiTLX protutijela koja *in vitro* blokiraju reakciju majčinih limfocita usmjerenu na limfocite roditeljskog partnera. Ta facilitacijska/ maskirajuća protutijela vežu se za antigene posteljice i sprečavaju stvaranje i djelovanje citotoksičnih mehanizama. Drugi tip protutijela jesu tzv. antiidiotipska protutijela, koja se vežu na receptore za antigene na citotoksičnim protutijelima i citotoksičnim limfocitima (217).

Njihovim stvaranjem blokira se prepoznavanje očevih antigena i stvaranje citotoksičnih T-limfocita. One bi mogle oštetiti fetalne stanice koje eksprimiraju očeve antigene.

Na osnovi pretpostavke da blokirajuća protutijela inhibiraju imunološki odgovor majke protiv fetusa, došlo se do zaljučka da bi njihova odsustnost rezultirala reprodukcijom neuspjehom. Do danas za otkrivanje blokirajućih protutijela nisu definirani specifični, standardizirani i provjerljivi testovi (22), a također je

slaba mogućnost reproducibilnosti rezultata među različitim laboratorijima (218). Dosadašnji podaci nisu dovoljno uvjerljivi da bi se tim sistemskim činiteljima, tj. blokirajućim protutijelima, moglo pripisati odlučujuće djelovanje u odnosu na druge supresijske faktore. Najbolji primjer jest agamoglobulinemična žena, koja u odnosu na opću populaciju nema većih problema sa zanošenjem i iznošenjem trudnoće, već ima problema zbog osjetljivosti na infekciju i s time povezanim problemima trudnoće.

Stimuliranjem majčinih B stanica mogu se proizvesti protutijela izravno protiv fetalnih HLA proteina, ako intaktne fetalne ili trofoblastne stanice uđu u majčinu cirkulaciju. Budući da su antiHLA protutijela rijetko nađena u žena s habitualnim pobačajima, neke istraživačke skupine u osamdesetim godinama pretpostavile su da su antiHLA protutijela potrebna za normalnu trudnoću i da bi njihovo odsustvo mogla biti obilježje neadekvatnoga imunološkog odgovora majke na fetus (219, 220). Kasnije je ovo shvaćanje osporavano. Danas se antiHLA protutijela ne smatraju značajnim čimbenikom za održavanje trudnoće, budući da ova protutijela mogu biti normalna u kasnijim razdobljima trudnoće. Ovo je podržano prospektivnom studijom 226 normalnih trudnica u kojih 62% žena koje su rodile živo dijete, nije razvilo antiHLA protutijela i većina žena koja su razvila protutijela učinile su to nakon 28. tjedna trudnoće (221).

Snižena koncentracija antiHLA protutijela u nekih žena s RM možda je zbog toga što se gubitak trudnoće dogodi prije nego što majka stvori antiHLA protutijela.

U serumima trudnica nađen je tzv. blokadni faktor koji čine ili kompleksi antigen-protutijelo ili slobodni antigen.

U suvišku protutijela kompleks bi prekrivao antigene ciljnih stanica, a u suvišku antigena kompleks bi blokirao receptore efektorskih stanica (npr. citotoksičnih limfocita).

Ima najmanje dvije vrste limfocita T (stanice $\alpha\beta^+$ i stanice $\gamma\delta^+$). Daleko su najvažnije i najbolje upoznate subpopulacije limfocita T $\alpha\beta^+$, a to su pomagački (Th) i citotoksični (Tc) limfociti T. Pomagački limfociti T gotovo uvijek izražavaju na površini molekulu (koreceptor) CD4 (CD4⁺ stanice), a citotoksični limfociti T molekulu (koreceptor CD8 (CD8⁺-stanice). CD4⁺ stanice prepoznaju tuđi antigen (peptid) u sklopu molekula HLA II. razreda na površini predočnih stanica, a CD8⁺ stanice u sklopu molekula HLA I. razreda. Pomagački limfociti T pružaju »pomoć« limfocitima B u proizvodnji protutijela na antigene ovisne o timusu i pomažu sazrijevanju precitotoksičnih limfocita T, nakon podražaja antigenom, u citotoksične *limfocite T* (112).

T limfociti čine 45% leukocita u proliferacijskom endometriju. Međutim, tijekom sekrecijske faze udio T limfocita postepeno se smanjuje i uterusne NK stanice postaju pretežita populacija leukocita (222). Značajno povećanje udjela T limfocita očekivano je nađeno u endometriju žena s RM koje su uzastopno pobačivale, u usporedbi s fertilnim ženama i ženama s RM koje su imale uspješne trudnoće (223,224).

Postoje polemike o važnosti na majčino fetalnom spoju prepoznavanja i aktivacije T limfocita na $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$ staničnim receptorima (TCR). Većina ljudskih decidualnih T limfocita eksprimira $\alpha\beta$ TCR (224). Međutim, $\alpha\beta$ TCR ne

prepoznaju, ili ne reagiraju na stanice trofoblasta u miša (226). Prepoznavanje $\gamma\delta$ T stanica nije spregnuto s glavnim sustavom tkivne kompatibilnosti (227), što omogućava ovim stanicama prepoznavanje različitog spektra antigena. Stanice koje nose HLA antigene zaštićene su od citotoksičnog ubijanja $\gamma\delta$ T stanicama (228). Prisutnost i udjel $\gamma\delta$ T stanica u ljudskom endometriju i decidui ostaje izrazito kontroverzna kao i njihova točna uloga u ljudskoj trudnoći.

Unutar majčinog endometrija i sijela posteljice dolazi do lokalne stanične adaptacije. Na tim mjestima rijetko se nalaze B-limfociti i zreli CD3 pozitivni T-limfociti.

Limfociti (CD3⁺) zastupljeni su u višestruko nižem postotku nego u perifernoj krvi majke. U humanim, kao i u mišjim trudnoćama supresivna aktivnost prisutna je u decidui za vrijeme uspješnih vitalnih alogenskih trudnoća, a opada u vrijeme kada se trudnoća približava terminu (229)

Osim decidualnih leukocita i same decidualne stanice izlučuju čimbenike koji imaju imunosupresivni učinak (230). Među decidualnim stanicama najbrojniji su makrofagi (CD14) s aktiviranim antigenom II. razreda HLA na površini, koji nedvojbeno, služe kao obrana od infekcije na tome vitalnom tkivnom mjestu u trudnoći. Oni predočavaju antigene, fagocitiraju, ali također izlučuju nespecifične imunosupresivne medijatore, kao npr. prostaglandin E₂ kojega se mehanizam djelovanja zasniva na inhibiciji proizvodnje interleukina 2 (IL2) i inhibiciji receptora za IL2 koji su preko potrebni za transplatacijsku reakciju. Tako se potiskuje reaktivnost T-limfocita.

Makrofagi također izlučuju razne citokine, kao što su M-CSF i TNF (tumor-nekrotizirajući faktor).

Znatnu ulogu u lokalnoj imusupresiji imaju i veliki granulirani limfociti (LGL-CD3⁻CD16⁺CD56^{bright}), koji su uz makrofage najbrojnije stanice u decidui, a gotovo su svi pozitivni na CD56 antigen (antigen NK stanica). Sinonimi su uterine NK stanice, veliki granulirani limfociti, endometrijski granulociti, K stanice, endometrijski granulirani limfociti (eGL) i decidualni granulirani limfociti (dGL) (14). Termin «uterine NK stanice» uključuje endometrijske i decidualne stanice, te granularne i agranularne oblike NK stanica (231).

U decidui njihov je postotak višestruko veći od postotka T-limfocita, što upozorava na moguće uloge tih stanica. U nizu eksperimenata potvrđeno je imunosupresivsko djelovanje decidualnih limfocita (među kojima su dominirali LGL), u testovima proliferacije limfocita periferne krvi na poliklonske mitogene i aloantigene sličan je učinak imao supernatant kulture istih stanica (140). U decidui pri kraju trudnoće znatno se smanjuje broj CD56 pozitivnih, a raste broj CD3 pozitivnih stanica.

LGL pobudili su mnogo pozornosti zbog svojega neuobičajenog fenotipa i funkcije.

Njihova funkcija hormonski je regulirana, i blisko su povezani s endometrijskim stromalnim stanicama i spiralnim krvnim žilama i žlijezdama (231). Nalaze se u endometriju sekrecijske faze ciklusa u znatno većem broju, nego u proliferacijskoj fazi te normalno nestaju za vrijeme menstruacije. U trudnoći njihov broj povećava se u decidui prvog tromjesečja (u ektopičnoj trudnoći, ili u bilo kojemu decidualno promijenjenom tkivu).

Tijekom sekrecijske faze i rane trudnoće NK stanice čine ~70% decidualnih leukocita (232), iako one postaju manje uočljive nakon 20. tjedna gestacije, ali većina NK stanica nestane iz endometrija pred termin (113).

NK stanice nađene u mukozi maternice obilježavaju njihova filoniksofilična, eozionofilna citoplazmatska granula (132). Razlikuju se od perifernih NK stanica svojim neobičajnim antigenim fenotipom, s većim udjelom CD56^{bright}, CD16⁻ i CD3⁻ (113).

Uterine stanice prirodne ubojice imaju veliku receptorske raznolikosti i pretežito su prisutne na majčino fetalnom spoju (113) od razvoja blastociste/trofoblasta nadalje. Prepoznavanje stanica trofoblasta od strane uterinih NK stanica možda je važno u inhibiciji NK ciljnog ubijanja, implantaciji blastociste, te rastu i razvoju posteljice.

Stanice s jednakim fenotipom broje <1% perifernih krvnih limfocita, implicirajući da postoji možda selektivno novačenje i/ili lokalna induktivna proliferacija NK stanica u uterusu (234).

Reproduktivni ishod možda je pod utjecajem promjena u broju, fenotipu ili funkciji uterinih NK stanica (231). Reproductivni neuspjeh u habitualnih pobačija je povezan sa smanjenjem CD16⁻CD56^{bright} i povećanjem broja CD56⁺CD16⁺ stanica u sekrecijskoj fazi endometrija i uzorku biopsije posteljice (235,223).

Uterine NK stanice mogu poticati ili inhibirati rast konceptusa. Uterine NK stanice CD16⁻CD56^{bright} mogu izlučivati citokine koji potiču rast posteljice, dok stanice CD16⁺ mogu inhibirati rast konceptusa, okidanjem NK staničnog ciljnog ubijanja. Stoga izmijenjene sekrecije citokina CD16⁺ stanica ili neuravnoteženost između CD16⁻CD56^{bright} i CD16⁺CD56^{dim} stanica može imati za posljedicu reprodukcijski neuspjeh (223).

Reprodukcijski neuspjeh može također biti uzrokovan sniženom koncentracijom uterinih NK CD57⁺ stanica (236).

U decidui kod spontnih pobačaja značajno je povećan broj uterinih CD57⁺ NK stanica u usporedbi s deciduom u normalnih trudnoća (236). Također je povećan broj ovih stanica u periimplantacijskom endometriju žena habitualnih pobačija (224).

NK stanice s CD56⁺/CD3⁻ fenotipom pronađene su većoj količini u normalnoj terminskoj posteljici nego u pupkovini i krvi majke. U decidui žena s početnim pobačajem nađena je deficijentna produkcija imunosupresijskog faktora rasta (TGF)β2 kojeg luče NK stanice.

NK stanice in vitro ne mogu ubiti stanice trofoblasta, ali NK stanice in vitro (LAK stanice) aktivirane s IL2 mogu ubiti stanice trofoblasta. Dodatno, aktivirane NK stanice mogu proizvoditi abortogene citokine(52).

U usporedbi s kontrolnom skupinom u perifernoj krvi žena habitualnih pobačija nađeno je značajno povećanje NK CD56⁺16⁺ (117,237).

Povećana aktivnost NK stanica u krvi netrudnih žena prediktivna je za ponavljane spontane pobačaje (117).

U miša CD8⁺ stanice su potrebne za imunološku zaštitu protiv pobačivanja ovisnog o NK stanicama.

Fetalni trofoblast ima malu u imunogeničnost iako eksprimira HLA-C, HLA-G, HLA-E antigene. U ljudi postoje dokazi da CD8⁺T stanice mogu prepoznati trofoblast. Ove CD8⁺T stanice nose $\gamma\delta$ tip receptora prije nego konvencionalne $\alpha\beta$ receptore koji prepoznaju antigene HLA-A,-B,-C. U uspješnoj trudnoći (ili poslije aktivacije T stanica nakon imunizacije) aktivirane su CD8⁺ stanice, ekspimirani su progesteronski receptori i luče se faktori koji inhibiraju aktivaciju NK stanica.

CD8⁺ stanice vežu se za HLA-G, ali ne znamo tip T staničnog receptora (Tcr) ovih stanica. Aktivirane CD8⁺ T stanice mogu proizvoditi citokine, i postavljena je hipoteza da neki od njih mogu pojačavati odgovor protutijelima (IL-4), inhibirati makrofage (IL-10) i olakšavati aktivaciju CD56⁺/CD16⁻ T stanica porijeklom iz koštane srži, poticati proizvodnju TGF β supresijskih stanica (IL-3, GM-CSF) nađenih u decidui, to jest blagotvorno djelovati na rast i diferencijaciju trofoblasta-tzv.imunotrofička hipoteza (237). Žene habitualne pobačije pokazuju manje CD8⁺stanica pomanjkanje aktivacije svojih CD8⁺T stanica u ranoj trudnoći. Također postoji manjak uterinih CD8⁻/ $\gamma\delta$ +stanica koje imaju fenotip CD56/16- i koje stvaraju TGF β 2 tijekom trudnoće (52).

Fetalni citotrofoblast pokazuje jaku obdarenost receptorima za faktor rasta, uključujući i one za CSF i interferon gama (IFN-gama), transferin i TNF-alfa (faktor nekroze tumora kojeg luče aktivirani makrofagi i mastociti).

Složeno međudjelovanje citokinske mreže unutar uteroplacentong tkiva omogućavalo bi imunosupresijsko djelovanje i podupiralo rast.

Tijekom alogeničke trudnoće posteljica adsorbira majčina protutijela usmjerena na antigene HLA očeva podrijetla i sprečava njihov ulazak u fetalnu cirkulaciju.

Protutijela koja se vežu na stanice posteljice bivaju intracelularno razgrađena i onda kao fragmenti otpuštena natrag u cirkulaciju (140).

Kao što je navedeno, u 40% parova koji habitualno pobačaju nije nađen genetski, endokrinološki, upalni, ni anatomski uzrok pobačivanju te je vjerojatno određeni broj tih pobačaja u prvom tromjesečju uzrokovan imunološki. Valja naglasiti da su habitualni pobačaji (partner specifični) vezani uz iste partnere. Uprkos pomanjkanju uvjerljivih dijagnostičkih testova za aloimune čimbenike, kao uzročnike habitualnih pobačaja, u mnogih parova s neobjašnjenim ponavljanim pobačajima primjenjuje se imunoterapija (239).

Na temelju pretpostavke da u žena koje habitualno pobačaju zbog imunoloških razloga nedostaju blokirajuća protutijela i supresorski faktori, koji sudjeluju u sprečavanju imunološkog odbacivanja embrija, započeto je krajem sedamdesetih godina liječenje tih parova paternalnim leukocitima (240), limfocitima nesrodnih davatelja (219) te osamdesetih godina infuzijom liofizata trofoblastne membrane (241), s ciljem da se aktivnom imunizacijom žena habitualnih pobačija koje su podudarne s partnerima u HLA i TLX antigenima, pobudi stvaranje blokirajućih protutijela i supresorskih faktora te na taj način spriječi imunološko odbacivanje embrija.

Liječenje se provodi davanjem injekcija leukocita (partnerovih i od donatora) intravenski i pod kožu prije trudnoće i u vrijeme nje prema različitim protokolima (a) 40-200 miliona stanica daje se intradermalno u dva ili više

navrata u razmaku od 4 do 6 tjedana, s time da se 1 mjesec nakon liječenja učini testiranje radi provjere da li je postignut željeni rezultat. Kada se postigne adekvatna razina protutijela, pacijentica može započeti sa zanošenjem.

Ili se b) 400 miliona ozračenih stanica; 2/3 i.v i jedna trećina iv/s.c uz četvrtu poticajnu dozu za 3 mjeseca bez obzira da li je došlo do trudnoće ili serokonverzije.

Booster imunizacija ako nije došlo do trudnoće niti serokonverzije unutar 3 mjeseca je 50 miliona stanica u 3 do 6 mjeseci ili 400 miliona stanica ako je prošlo više od 6 mjeseci (52).

U prvim izvješćima uspješnost se kretala od 58 do 100% (219, 242, 243, 244, 245, 246).

Međutim, nekoliko randomiziranih dvostruko slijepih studija iznose kontroverzne rezultate i njihove interpretacije (247, 220, 248, 249).

Rezultati nedavnih, randomiziranih, placebo kontrolnih kliničkih pokusa pokrenuli su pitanje efikasnosti imunoterapije-leukocitima habitualnih pobačaja.

Većina kliničkih pokusa pokazala je stopu uspješnosti trudnoća od 70% s primjenom imunoterapije-leukocitima.

Kontroverza proizlazi iz različite stope uspješnosti u kontrolnoj populaciji koja je u rasponu od 29 do 76%.

Objašnjenja za te varijacije uključuju malu veličinu uzorka, heterogenost proučavane populacije isto kao i istodobni učinak placeba.

Predlaže se metaanaliza da istraži ta objašnjenja (249).

Daya i suradnici Metaanalizom nisu našli dokaze za uspješnost liječenja imunizacijom s očevim leukocitima i djelovanja antipaternalnih protutijela u žena s neobjašnjenim habitualnim pobačajima (251). Dok je pak druga metaanaliza pokazala da terapija očevim limfocitima povećava relativni rizik živorođenosti u odnosu na placebo (66, 252). U nedavnoj multicentričnoj randomiziranoj dvostruko slijepoj studiji nije nađeno da imunizacija očevim monocitima u odnosu na placebo-fiziološko otopinu poboljšava ishod trudnoća u habitualnih pobačaja (192).

Mnogi autori našli su kod žena koje habitualno pobačaju podudarnost s partnerom u HLA-antigenima (104, 240, 253, 254, 255, 256, 257, 258), dok drugi istraživači nisu kod svojih ispitanica potvrdili tu podudarnost (106, 259, 260, 261). Prema drugim istraživačima postoje čvrsti dokazi da stupanj HLA podudarnosti nema prognostičku vrijednost s obzirom na ishod budućih trudnoća (262, 263).

Ober i suradnici su našli proučavajući blisko srodnu populaciju Hutterit-a, da je homozigotnost i podudarnost u HLA-B antigenima i HLA-B vezanim alelima povezana s povećanom učestalošću sporadičnih fetalnih gubitaka. Molekularna subtipizacija HLA-B alela i genotipizacija alela za HLA-B vezane lokuse trebala bi pomoći u diskriminaciji između ovih mogućnosti (134, 135).

Gerenc̄er i suradnici našli su kod žena koje habitualno pobačaju značajnu HLA sukladnost s partnerom i oslabljenu MLR reaktivnost te mnogo veću

zastupljenost HLA-A9 lokusa u tih žena (255, 256). Malo je studija istraživalo distribuciju antigena HLA II.razreda među ženama habitualnim pobačilkama. Nekoliko studija našlo je povećanu učestalost HLA DR5 antigena u habitualnih pobačilkama (264, 265, 266).

Humar je našla izrazitu podudarnost u DQ regiji između partnera primarnih abortera uz istovremenu različitost u odgovarajućim HLA-DR antigenima (136).

U velikoj studiji u kojoj su HLA geni određivani metodama DNA; RFLP (restriction fragment length polymorphism); značajno je povećana frekvencija HLA-DR1 i –DR3 alogenotipova među ženama s najmanje četiri i više prethodna neobjašnjena gubitka trudnoće u usporedbi s kontrolnom skupinom žena, te značajno povećanje s obzirom na broj prethodnih fetalnih gubitaka (267). U drugoj studiji autor nalazi da žene habitualne pobačilje s HLA-DR1 i –DR3 alogenotipom imaju značajno veća učestalost pobačaja u sljedećim trudnoćama (268).

Čak je istraživanjem obitelji žena habitualnih pobačilkama; našao da njihove sestre i braća s DR1 i DR3 antigenima češće pobačaju u svakoj njihovoj trudnoći u odnosu na kontrolu (Odds ratio (OR) of 5.0 uz 95% raspon pouzdanosti (confidence intervals) 2.0-11.0; $P < 10^{-5}$) (269).

Christiansen i suradnici učinili su metaanalizu učestalosti HLA-DR1 i DR3 antigena među bijelim ženama s neobjašnjenim habitualnim pobačilkama (uključene su i studije s dva i više neobjašnjena pobačaja), iz studije su isključene bolesnice s autoprotutijelima.

Učinjena je metaanaliza 18 studija za procjenu učestalosti HLA-DR3 antigena i 17 studije za HLA-DR1 antigene u populaciji bijelih žena s neobjašnjenim ponavljanim pobačilkama.

Antigen DR1 značajno je učestaliji među ovim pacijenticama (OR engl. Odds ratio) omjer vjerojatnosti je 1,29 uz 95%-tni interval pouzdanosti (95%-tni CI engl. confidence interval).

Ovaj nalaz dopušta zaključak da geni koji kodiraju HLA-DR1 antigen (uključujući DRB1* 01 alele) ili geni koji su u linkage disequilibrium-u s ovim alelima daju osjetljivost na ponavljane pobačaje.

Nije nađena značajno povećana učestalost HLA-DR3 antigena, među ovim bolesnicama (270), razlog je vjerojatno u tome što je taj antigen učestaliji kod bolesnica s prisutnim autoprotutijelima (271).

Nove kontrolne studije o učestalosti HLA gena drugog razreda potrebno je učiniti s time da bi trebalo upotrebljavati suvremene metode DNA tehnologije, te uključiti bolesnice s najmanje tri pobačaja, te ne isključivati bolesnice s autoprotutijelima (270).

Geni usko vezani uz HLA-DR mogu također igrati ulogu u osjetljivosti na imunološka oboljenja i neobjašnjene ponavljajuće pobačaje. Gen za TNF- α blisko je smješten uz HLA-DR, i izvijesteno je da HLA-DR1, -DR3 i –DR4 aleli u linkage disequilibrium s TNF- α genima predisponiraju hipereskreciju TNF- α in vitro (272)). To potvrđuje studija koja pokazuje da je visoka koncentracija TNF- α u krvi trudnih žena povezana s visokim rizikom novog pobačaja (273).

Problemi su u analizi rezultata zbog razlika u definicijama habitualnih pobačaja i različitim kontrolnim skupinama, te različitim metodama tipizacije HLA.

Karhukorpi i suradnici u parova s tri i više spontana pobačaj određivali su HLA-G lokuse metodama molekularne biologije PCR-RFLP. Nisu našli nikakvu povezanost između habitualnog pobacivanja i lokusa HLA-G (274).

Yamashita i suradnici analizirali su gene HLA-G s PCR (polymerase chain reaction), exon 2,3,4 i intron 4 u 20 parova s anamnezom habitualnih pobačaja te nisu našli nikakvu značajniju učestalost određenih alela HLA-G među parovima s habitualnim pobačajima u odnosu na zdrave jedinice (275). Postojanje alela HLA-G*0104 ili HLA-G*0105N u oba partnera (s iskustvom habitualnog pobacivanja) značajno povećava rizik pobacivanja u sljedećoj trudnoći. Ti aleli definirani su polimorfizmom u alfa-2 domeni i kodiraju varijante proteina koji su prisutni samo u punoj dužini HLA-G1 proteina. Značajan genotip-specifičnog rizika u ovoj populaciji pretpostavlja da su varijacije alela u alfa-2 domeni HLA-G1 izoforma činioci koji doprinose rekurentnom pobacivanju (276).

Pfeiffer i suradnici našli su povećanu učestalost HLA-G*01013 ili *0105N alela u žena habitualnih pobacilja u odnosu na kontrolnu skupinu fertilnih žena (277).

Upitna je efikasnost imunizacije habitualnih pobacilja leukocitima, a njihova primjena povezana je s brojnim opasnostima (250). Nuspojave imunizacije majke s očevi leukocitima su brojne i uključuju; stvaranje limfocitotoksičnih aloprotutijela, transfuzijsku reakciju, prijenos virusa hepatitisa i citomegalovirusa, razvoj antieritrocitnih i antitrombocitnih protutijela ili čak autoimunih oboljenja (reumatoidnog artritisa, Henoch-Schönlein-ove purpore) zbog odlaganja imunih kompleksa. Opisana je i kožna reakcija slična odbacivanju transplantata, te neonatalna aloimuna trombocitopenija (278).

Uspješnost liječenja habitualnih pobačaja infuzijom liofizata trofoblastne membrane u prvom izvješću iznosi 76% (241). Međutim, u kontrolnoj randomiziranoj dvostruko slijepoj studiji trofoblastne membrane nisu pokazale uspješnost liječenja u odnosu na infuziju intralipida (279). Liječenje habitualnih pobačaja intramuskularnim davanjem aktivirane, ultravioletno ozračene, hemolizirane autologne krvi prije i tijekom trudnoće, iznešeno u pilot studiji Pfeiffer i suradnika, pokazalo je dobre rezultate, 86% živorođenih, ali zaključke je teško donositi zbog malog ispitivanog uzorka. Tijekom liječenja u pacijentica su nađene značajne promjene u subpopulaciji limfocita, nivou komplemanta plazme, mitogenoj stimulaciji i razini imunoglobulina (278).

Psihoterapija je pokazala isto tako dobar uspjeh u liječenju habitualnih pobačaja neobjašnjenog uzroka kao i imunoterapija, čak 85% (280). Bergant i suradnici u svom istraživanju nisu našli utjecaja psiholoških faktora na habitualno pobacivanje (281). Samo intenzivna briga, bez medikamentozne terapije, u ranoj trudnoći značajno poboljšava ishod trudnoće kod žena s prethodnim habitualnim pobačajima (51%), u odnosu na one koju tu brigu nisu imale (26%) (26).

Vaginalni supozitoriji sjemenske plazme rabljeni su u liječenju habitualnih pobačaja, ali s poražavajućim rezultatima (250).

Kao marker imunološkog odgovora na danu imunoterapiju leukocitima uzima se stvaranje antipaternalnih komplement ovisnih protutijela (APCA), koja inhibi-

ranju stvaranje formacija Fc rozeta, imunofagocitozu i miješanu limfocitnu reakciju (282).

U drugoj studiji Hwanga i suradnika, 1992. nađeno je da za uspješnost trudnoće nisu bitni niti blokadni faktori, niti APCA, već da oni vjerojatno odražavaju imunološki odgovor majke na fetalne antigene (283).

Na precijenjenu ulogu podudarnosti partnera u HLA-antigenima i odsutnost citotoksičnih/necitotoksičnih protutijela i FcR-blokirajućih protutijela kao prognostičkih i dijagnostičkih pokazatelja u imunološki uzrokovanim habitulanim pobačajima ukazuju i drugi autori (273).

Intravenski imunoglobulini (IVIG) prikupljeni iz plazme više davatelja primjenjuju se u liječenju habitualnih pobačaja od 1986. godine, nakon dokaza Neperta i suradnika (284) da svi preparati intravenskog imunoglobulina sadržavaju i blokirajuća protutijela koja inhibiraju imunofagocitozu. Ranih osamdesetih intravenski imunoglobulini počeli su se primjenjivati u liječenju bolesti i to poglavito kao supstitucija protutijelima kod bolesnika s primarnom ili sekundarnom humoralnom imunodeficijencijom (285, 286). Također su pokazali djelotvornost u liječenju idiopatske trombocitopeničke purpore kod odraslih i djece (285, 287, 288, 289), sistemskog lupusa eritematodesa s pozitivnim LA (290), autoimune hemolitičke anemije (105), neonatalne aloimune trombocitopenije (285), post-transfuzijske purpore (285), u liječenju habitualnih pobačaja prouzrokovanih pozitivnim LA (291), trombocitopeničke purpore u trudnoći (292), aloimune trombocitopenije fetusa (293), neobjašnjene hemolitičke anemije majke u trudnoći (294) i Rh-senzibilizacije u trudnoći (295, 296).

Pacijentice koje primaju IVIG mogu razviti alergijsku reakciju. IgA, aktivator prekalikreina i beta-lipoprotein jesu onečišćenja u preparatima imunoglobulina koji najvjerojatnije izazivaju alergijsku reakciju za vrijeme davanja IVIG-a.

Ne postoje izvješća HIV-prijenosa upotrebom IVIG-a, ali postoje pojedinačna izvješća o prijenosu non-A, non-B hepatitisa specifičnih skupina pacijenata. Upotrebu IgG-a stoga valja nastaviti pratiti pažljivo i primjenjivati ga samo u specifičnim kliničkim indikacijama (285). Nakon uvođenja u liječenje IVIG-a ranih sedamdesetih prošlog stoljeća prva opažena štetna djelovanja potjecala su od aktivacije agregacije imunoglobulina komplementom. Poboľjšanim postupkom pripreme IVIG-a eliminirani su ovi problemi. Novozamijećena štetna djelovanja kao što su hiperviskoznost, aseptički meningitis ili bubrežna insuficijencija mogla bi se pripisati izvjesnim komponentama preparata IVIG, načinu primjene ili posebnim osobinama pacijenata.

Štetna djelovanja IVIG-a dijelimo u tri tipa:

- a) štetna djelovanja koja nastaju odmah tijekom primjene IVIG (npr. anafilaktoidne reakcije);
- b) odgođena štetna djelovanja (ona koja se događaju nekoliko sati do dana od uvođenja infuzije (npr. štetna djelovanja na bubrege, pluća i kožu, hiperviskoznost, aseptički meningitis, artritis, infarkcije mozga, hemoliza i leukopenia)

- c) kasna štetna djelovanja (npr. prijenos infektivnih uzročnika-hepatitisa C i dr.) (297).

U prvom objavljenom članku o liječenju vjerojatno imunološki uzrokovanih habitualnih pobačaja, primarnih i sekundarnih pobacilja, IVIG-om, stopa uspješnosti je 82%, dok je uspješnost za primarne pobacilje 86%, s time da su u postupak ulazile ispitanice sa dva i više spontanih pobačaja (298).

U sljedećoj studiji istog autora nađena je stopa uspješnosti od 75% kod 35 ispitanica primarnih pobacilja i 60% u 12 ispitanica sekundarnih pobacilja s tri i više habitualna pobačaja, s time da su se kao uspješne trudnoće računale sve porođene te i tekuće trudnoće iznad 25. tjedna trudnoće (299).

Marzusch i suradnici liječili su primarne i sekundarne pobacilje s dva i više spontanih pobačaja IVIG-om. Uključene su ispitanice s negativnim nalazom limfocitotoksičnih HLA-protutijela. Stopa uspješnosti liječenja je 82%, dok je za primarne pobacilje s tri i više pobačaja stopa uspješnosti 76,4%. Kao uspješnu trudnoću računao je onu koja se nastavila nakon 20. tjedna (300).

Reznikoff-Etievant i suradnici liječili su IVIG-om 35 ispitanica s tri i više habitualnih pobačaja i negativnim nalazom limfocitotoksičnih protutijela. Stopa uspješnosti liječenja je 81,3%, s time da su u analizu uzeli samo rođenu djecu (300).

Christiansen i suradnici liječili su 11 žena s četiri i više spontana pobačaja IVIG-om (5 sekundarnih i 6 primarnih pobacilja) sa stopom uspješnosti 82% (9 od 11), s time da je od 6 primarnih pobacilja 4 rodilo, a 2 su pobacile u prvom tromjesečju (156).

Prema studiji Heilmanna i suradnika od 25 žena liječenih IVIG-om, s dva i više habitualnih pobačaja, 16 je rodilo, 2 su pobacile, a 7 je trudnoća u tijeku od 10. do 37. tjedna trudnoće. U toj studiji nije nađena povećana tendencija trombozi ili smanjenje interviloznog protoka tijekom primjene IVIG-a (301).

U svim navedenim studijama kod analize uspješnosti liječenja IVIG-om isključivani su pobačaji kojima je nađen drugi uzrok te ektopične trudnoće.

U preglednom članku Heine i suradnici iznose ukupna europska iskustva u liječenju žena primarnih i sekundarnih pobacilja IVIG-om. Postignuta stopa uspješnosti je 76,4% (108 rođenih od 140 liječenih) (300).

Stricker i suradnici liječili su IVIG-om (0,2 mg/kg) habitualne pobacilje s jednom ili više imunoloških abnormalnosti (pozitivna antifosfolipidna protutijela, antitiroidna protutijela, antinuklearna protutijela, antiovarijska protutijela, povećanje razine NK stanica, povećan omjer CD4/CD8 T limfocita, endometriozom).

Liječenje su započeli u folikularnoj fazi ciklusa u kojem se očekivala koncepcija, ako je došlo do zanošenja, liječenje je nastavljeno u istoj dozi svaki 28 dana do 26-30 tjedna gestacije. Raspon dobi pacijentica je 28-45 godina. Od 24 liječene trudnice 22 su rodile zdravu djecu, i autor zaključuje da je liječenje niskim dozama IVIGa korisno u starijih habitualnih pobacilja s imunološkim poremećajima (302).

U njemačkoj (German RSA/IVIG Group) kontrolnoj multicentričnoj dvostruko slijepoj studiji nije pokazana specifičnost djelovanja IVIG-a u liječenju habitualnih pobačaja u odnosu na 5% albumin.

Liječenje je započeto nakon utvrđivanja trudnoće pozitivnim β HCG testom s 30 grama (600ml) IVIG/5% albumin, daljnje infuzije svaka tri tjedna do 25. tjedna trudnoće s po 20gr IVIG/5% albumin.

Zbog malog broja liječenih bolesnica nisu isključeni ni lažno negativni rezultati. Radi homogenosti uzorka uključeno je 65 ispitanica primarnih pobačaja s tri i više spontana pobačaja ispod 16. tjedna trudnoće. Sve ispitanice bile su mlađe od 40 godina. Kod 33 ispitanice primijenjen je IVIG, a u 31 5% albumin (jedna žena napustila je liječenje na samom početku). Uspjeh je definiran kao trudnoća u tijeku i/ili porod iznad 28. tjedna gestacije.

Stopa uspjeha za ispitanice liječene IVIG-om iznosi 61% (20 od 33), a za placebo-5% albumin 68% (21 od 31).

Međutim, ako se iz analize isključe pobačaji sa objašnjenim uzrokom, tada je za ispitanice liječene IVIG-om stopa uspjeha 74% (20 od 27) i 70% (21 od 30) za ispitanice liječene 5% albuminom.

Zanimljivo je napomenuti da su se nuspojave, kao glavobolja, povišena tjelesna temperatura, mučnina i/ili kratkotrajno vaginalno krvarenje pojavile u 6 žena. Pet od njih primale su placebo. Smetnje su se javile kod 5 žena nakon prve infuzije.

Također je dokazano da je stopa uspješnosti liječenja viša ako je liječenje započeto prije bez obzira jesu li primijenjeni albumini ili IVIG. Nije nađena razlika u trajanju trudnoće, porodnoj težini i duljini, težini posteljice između ispitanica liječenih IVIG-om i ispitanica liječenih albuminom. (303).

Coulam i suradnici proveli su multicentričnu randomiziranu dvostruko slijepu studiju u koju su uključili 95 ispitanica; Od 61 trudnice 29 je primalo IVIG a 32 placebo-0,5% albumin.

Uključene su pacijentice koje su prethodni imale dva ili više uzastopna spontana pobačaja s istim partnerom do 20. tjedana i to primarne (49 žena) i sekundarne (46 žena) pobačaje. U dobi od 18 do 45 godina.

Liječenje je započeto IVIG 500mg/kg ili placebo-0,5% albuminom kroz 4 mjeseca u folikularnoj fazi menstruacijskog ciklusa pred ovulaciju.

Ukoliko je došlo do trudnoće liječenje se nastavilo svakih 28 dana (500mg IVIG/albumin) sve do poroda ili do 28-32. tjedna trudnoće.

Stopa uspjeha za IVIG iznosi 62,1% (18/29), a za placebo-0,5% albumin 34% (11/32).

Uspjeh terapije smatrao se porod živorođenog novorođenčeta (304).

Christiansen i suradnici proveli su u Danskoj randomiziranu zatvorenu izoliranu dvostruko slijepu studiju (305).

Uključili su sekundarne pobačaje s neobjašnjenim uzrokom pobačavanja s 3 i više pobačaja i primarne pobačaje s jednim ili više pobačaja ≥ 14 tjedna. Liječene su 34 trudnice; 17 je liječeno IVIG-om, a 17 placebo-5% albuminom.

Liječenje je započeto u 5. tjednu trudnoće s 30-40 grama IVIG sljedeće infuzije od 20-30 grama svaki tjedan do 8. tjedna potom svaka 2 tjedna po 20-30 grama do 34. tjedna.

Stopa uspjeha liječenja IVIG-om iznosi 52,9% (9/17), a ako se učini korekcija – isključe poznati uzroci pobačavanja, onda je stopa uspješnosti liječenja 56%, a za placebo 1,5% albumin je 29,4% (5/17).

Kriterij uspješnosti terapije su vijabilne trudnoće ≥ 28 .

Nije nađena razlika u razini antikardiolipinskih protutijela niti drugih autoprotutijela tijekom trudnoće u njemačkoj i danskoj studiji između pacijentica liječenih IVIG u odnosu na placebo. Nakon prve infuzije IVIG nije došlo do snižavanja autoantitijela u ove dvije kontrolne studije (305,108).

Stephenson-ova i suradnici (239) proveli su u Kanadi prospektivnu randomiziranu dvostruko slijepu placebo kontrolnu studiju u koju su uključili 62 pacijentice primarne i sekundarne habitualne pobačilje s prethodno 2 i više uzastopna spontana pobačaja ispod 20. tjedana (isključeni su genetski, autoimuni, endokrini upalni anatomske uzroci pobačavanja, te žene ispod 18 i iznad 45 godina, i one koje su istovremeno uzimale acetilsalicilnu kiselinu, heparin, glukokortikoide, progesteron ili klomifen citrat).

Kroz 6 ciklusa u folikularnoj fazi u doba očekivanog zanošenja davano je 500mg/kg IVIG ili odgovarajuća količina fiziološke otopine, ukoliko je došlo do zanošenja liječenje se nastavilo infuzijom 500mg IVIG/placebo-odgovarajuće količine fiziološke otopine svakih 28 dana do 28-32 tjedna trudnoće.

Kriterij uspješnosti liječenja bile su vijabilne trudnoće >20 . tjedana.

Od 39 trudnica 20 je liječeno IVIG-om, a 19 placebom-fiziološkom otopinom.

Stopa uspjeha liječenja IVIG je 50% (10/50), a u placebo skupini 52,6% (10/19) (239).

Perino i suradnici objavili su rezultate talijanske multicentrične randomizirane dvostruko slijepu kontrolnu studiju. Uključeno je 46 primarnih pobačilja mlađih od 42 godine s tri i više uzastopna spontana pobačaja prvog tromjesečja s istim partnerom u kojih su isključeni drugi uzroci pobačavanja uključujući i autoimuni. Odmah nakon potvrde trudnoće, a prije pojave srčane akcije započeto je liječenje s infuzijom IVIG-a 25g/dnevno kroz 2 uzastopna dana i treća doza od 25g/dnevno za tri tjedna, isti volumen i režim primijenjen je u placebo skupini s 5% albuminom.

IVIG su primile 22 pacijentice, a placebo-5% albumin 24 pacijentice.

Kriterij uspješnosti terapije su trudnoće koje su se normalno nastavile razvijati ≥ 12 . tjedna.

Stopa uspjeha kod liječenih IVIG-om je 68%, a u placebo skupini 79% (306).

Jablonowska i suradnici proveli su Švedsku randomiziranu dvostruko slijepu placebo kontrolnu studiju. Liječena je ukupno 41 žena; 20 primarnih i 21 sekundarnih pobačilja s tri i više uzastopna spontana pobačaja do 20. tjedna s istim partnerom.

IVIG-om je liječeno 22 trudnice, a placebo je dobile 19 trudnica. Prethodno su isključeni drugi uzroci pobacivanja uključujući i autoimuni.

Liječenje je započeto nakon potvrde srčane akcije transvaginalnim ultrazvukom IVIG-om 20 grama/400ml otopine ili placebo- 400ml fiziološke otopine. Sljedećih 5 infuzija IVIG 20 gr/400 ml ili placebo slijedilo je u trotjednom razmaku.

Kriterij uspjeha terapije su trudnoće \geq 28 tjedna.

Stopa uspjeha terapije za IVIG je 77% (17/22), za placebo 79% (15/19).

S time da za primarne pobacilje za IVIG iznosi 82% (9/11), a za placebo 89% (8/9). Za sekundarne pobacilje za IVIG iznosi 73% (8/11), a za placebo 70% (7/10).

Šest žena koje su primale IVIG imalo je blage nuspojave; osip, svrbež, povećanu tjelesnu temperaturu, te vaginalno krvarenje. Dvije žene u placebo skupini također su imale nuspojave; jaki svrbež kože i osrednje vaginalno krvarenje (307).

Metaanaliza četiri randomizirane dvostruko slijepa studije (303, 304, 305, 239) o djelovanju IVIG u liječenju spontanih habitualnih pobačaja, pokazala je da IVIG može imati ulogu u liječenju istih. Apsolutni efekat liječenja je 10,1% u korist IVIG, ali još nisu upotrebljivi konačni dokazi, budući da je za adekvatan test potreban uzorak od najmanje 764 ispitanice (analizirano je 196 ispitanica). I danska i kanadska studija pokazale su se uspješnijima u liječenju IVIG-om sekundarnih pobacilja (25).

Daya i suradnici učinili su 1999. godine metaanalizu svih šest dosada provedenih randomiziranih dvostruko slijepih placebo kontrolnih studija liječenja imunoglobulinom/placebo habitualnih pobačaja (308), s ciljem da se utvrdi poboljšava li IVIG šansu za uspješnu trudnoću u habitualnih pobacilja i da istraži efekt kliničkih varijabilnosti na ishod trudnoće.

U analizu su uključene bolesnice spomenutih studija koji su zadovoljavali sljedeće kriterije: tri ili više uzastopna spontana pobačaja do 20. tjedna trudnoće s istim partnerom; isključene anomalije uterusa; normalni kariotipi u partnera i nema dokaza za autoimunosne bolesti, nije postavljena dobna granica. U dvije studije u kojih je liječenje započeto prije koncepcije, u analizu su uključene samo ispitanice koji su zatrudnjele u promatranom razdoblju. Posebno su označene primarne a posebno sekundarne pobacilje. Kao uspjeh smatrala se trudnoća \geq 20 tjedana.

Analizirano je 125 pacijentica u IVIG skupini i 115 u placebo skupini.

Ukupna stopa uspjeha za IVIG iznosi 62,4% (78/125), a za placebo 61,7% (OR=1.08, 95% CI=0.63-1,86, P=0.78).

Logističkom regresijskom analizom podataka, broj prethodnih pobačaja (OR=0.56) i dob trudnice bili su značajni prediktor uspjehnosti trudnoće.

Christiansen i suradnici 2002. godine objavili su rezultate randomizirane dvostruko slijepa placebo kontrolne studije u liječenju 58 ispitanica primarnih i

sekundarnih pobacilja s najmanje 4 pobačaja neobjašnjelog razloga prije 26. tjedna trudnoće od kojih su najmanje tri bila uzastopna.

Liječenje su započeli odmah nakon potvrde trudnoće pozitivnim testom β HCG-a iz seruma ili urina. Infuzije IVIG-a u dozi 0,8g/kg TT do 20. tjedna trudnoće, a od 20-26. tjedna infuzije u dozi od 1g/kg TT. Liječenje su ponavljali svaka 2 tjedna do 26. tjedna. Placebo infuzije 1,5% albumina davali su po istom protokolu.

Stopa uspjeha u obje liječene skupine je 45% (13/29).

U sekundarnih pobacilja stopa uspjeha liječenja IVIG-om je 50% (6/12), a u placebo skupini 23% (3/13) (309).

Vrijeme primjene IVIG-a (prije ili poslije koncepcije) nije imalo djelovanja na konačan ishod.

Pitanje optimalne doze IVIG se postavlja (307), budući su Yamada i suradnici u liječenju žena primarnih pobacilja s 4 i više pobačaja neobjašnjelog uzroka primijenili (od 4-7 tjedna trudnoće) kroz 5 uzastopnih dana infuziju IVIG-a 20g/dnevno (ukupna doza od 100g). Od 11 liječenih trudnica, 2 su pobacile zbog poremećenog kariotipa u prvom tromjesečju, a 9 je rodilo (310).

Malo se zna o imunomodulativnom djelovanju albumina. Topive molekule HLA nađene su ne samo u preparatima IVIG-a (311) nego i u malim količinama i u preparatima albumina (312). Pretpostavlja se da i drugi derivati plazme kao preparati faktora VIII imaju imunomodulatorno djelovanje. Ne može se isključiti da albumin u koncentraciji od 5% ima imunomodulatorno djelovanje (304), visoke doze albumina mogle bi smanjiti razinu steroidnih hormona i drugih supstancija potencijalno štetnih za trudnoću (108).

Točan mehanizam djelovanja IVIG-a nije potpuno objašnjen. Jasno je da, uz pasivni transfer, protutijela djeluju i imunosupresivno (285), pojačavaju broj i aktivnost imunosupresivnih T-limfocita CD8 (288), snižavaju funkcije B limfocita (313), blokiraju fragment C3 komplementa na ciljnoj stanici (314), inhibiraju fagocitozu posredovanu Fc receptorom (315), snižavaju Fc receptore IgG (316), blokiraju posteljini transport majčinih endogenih citotoksičnih IgG (317) i smanjuju aktivnost NK-stanica (stanica prirodnih ubojica) (318), suprimiraju in vivo antikardiolipinska protutijela u žena koje habitualno pobacuju /RSA / (116, 319). Imunomodulatorni učinak očituje se preko djelovanja antiidiotskih protutijela (317) i mehanizma negativne povratne sveze na inhibiciju sinteze autoprotutijela (289). Činjenica je da je u uspješnim trudnoćama liječenim infuzijama IVIG-a nađena u perifernoj krvi značajno veća supresija broja NK stanica CD56⁺ i CD 56⁺/16⁺, što je dovelo do povećanja upotrebe IVIGa u liječenju žena habitualnih pobacilja (25, 237).

Zapažanje da liječenje IVIG-om dovodi do smanjenja broja i citotoksičnosti NK stanica unutar 7 dana od tretmana ukazuje da liječenje IVIG-om treba započeti prije, a ne nakon što je došlo do implantacije (25).

Beer i suradnici iznose 5 kategorija imunoloških problema koji mogu dovesti do reproduktivnog neuspjeha uključujući i neuspjeh IVF-ET, to su:

1. podudarnost partnera u HLA-DQA1 antigenima, što sprečava aloimuno prepoznavanje trudnoće
2. stvaranje antifosfolipidnih protutijela
3. stvaranje protutijela za DNA, polinukleotide i histone
4. multiorganski autoimunosni poremećaji
5. aktivacija dviju vrsta stanica koje proizvode efektore koji smetaju razvoju jajašca, ovulaciju, dijeljenje i implantaciju. To su CD56⁺NK stanice koje proizvode citotoksične citokine za rani embrij i deciduu i CD 19⁺5⁺B1 stanice koje proizvode protutijela za hormone (estrogene, progesteron, humani horionski gonadotropin i neurotransmitere- enkefalin, serotonin, endorfin) (320).

Potrebno je učiniti valjan odabir žena koje habitualno pobačaju i žena s neuspjelim IVF-ET da bi se odredila nužnost liječenja IVIG-om. Koristi od liječenja IVIG-om imat će žene s aloimunim i autoimunim abnormalnostima i RSA (kategorija 2,3,4,) kod koji je bila neuspješna terapija transfuzijama leukocita, heparinom, aspirinom, i/ili prednisolonom ili koje su postale refraktorne na konvencionalnu imunoterapiju. Imat će također koristi od liječenja IVIG-om žene s RSA i multiorganskim autoimunim poremećajima te žene s povišenom razinom ili aktivnošću NK stanica (Kategorija 5) (52, 320).

Za razliku od navedenih studija u našu studiju bile su uključene samo primarne pobačije s tri i više uzastopna spontana pobačaja prvog tromjesečja. Svi parovi uključeni u studiju bili su podudarni u HLA-D antigenima, budući da je Humar još 1992. godine iznijela rezultate o značajnijoj podudarnosti habitualnih pobačija u HLA-DQ lokusima u našoj populaciji (136). U svim drugim studijama to nije bio kriterij iako je to jedan od mogućih parametara aloimunog odbacivanja. Bili su također isključeni i autoimunosni uzroci pobačivanja. U skupini IVIG-a u odnosu na kontrolnu skupinu bilo je nešto više pobačaja 3,63/3, a također je IVIG skupina bila nešto starija od kontrolne skupine 31,8/27,9 godina.

Stopa uspjeha terapije kod IVIG-a iznosila je 85%, dok je za kontrolnu skupinu stopa uspjeha iznosila čak 90%, što se može povezati s imunomodulatornim djelovanjem progesterona.

Stopa uspjeha i u IVIG skupini i u kontrolnoj skupini veća je nego u svim dosadašnjim navedenim studijama. Vjerojatno razlog leži u dobrom izboru parova s aloimunim uzrokom pobačaja (podudarnost u HLA-D antigenima, te postojanje istih antigena u habitualnih pobačija).

Različiti su i kriteriji uspješnosti liječenja u svim do sada objavljenim studijama. Kreću se od vijabilnih trudnoća od 12. tjedna naviše. Različiti su bili također i kriteriji uključivanja u studiju. Neki uzimaju pobačije s dva i više spontanih pobačaja, drugi s tri i više spontanih pobačaja bez obzira na uzrok i vrijeme prethodnog pobačivanja. Mi smo točno definirali skupinu primarnih pobačija s

tri i više prethodnih spontanih pobačaja u prvom tromjesečju s urednim kariotipom pobačenih zametaka i podudarnosti u HLA-D antigenima partnera.

Budući da su trudnoće habitualnih pobacilja same po sebi visokorizične, povećana učestalost serklaža i carskih rezova nije neuobičajena. Mi nismo radili preventivne serklaže već samo ukoliko je bilo kliničkih i UZV znakova inkometencije cerviksa. Učestalost drugih opstetričkih oboljenja i komplikacija trudnoće u obje promatrane skupine bilo je podjednako. Odgovarali su visokorizičnim trudnoćama. Nešto je veća učestalost završenja poroda carskim rezom u obje promatrane skupine. Komplikacije i nepovoljna djelovanja IVIG bila su kako je opisano u literaturi, blaga i nisu zahtijevala prekid liječenja. Serumske koncentracije TNF α i IL-2 u habitualnih pobacilja nisu se pokazale kao specifični parametri za procjenu ishoda trudnoće i eventualnog blagotvornog djelovanja IVIG-a/didrogesterona .

ZAKLJUČCI

1. Stopa uspjeha liječenja habitualnih pobačaja IVIG-om je 85%, dok je za kontrolnu skupinu stopa uspjeha čak 90%, što se može povezati s imunomodulatornim djelovanjem progesterona, te dobrim izborom parova s aloimunim uzrokom pobacivanja.
2. Broj komplikacija trudnoće i poroda u obje ispitivane skupine bila je podjednaka i odgovarala je visokorizičnim trudnoćama.
3. Nije bilo značajnih nuspojava prilikom primjene imunoglobulina, koje bi dovele do prekida liječenja.
4. IVIG treba primjenjivati kod strogo izabranih skupina habitualnih pobacilja, kako s aloimunim tako i autoimunim poremećajima kod kojih uobičajena terapija (gestagenima, aspirinom, kortikosteroidima, heparinom) nije dala rezultate, a imale su više od 3 pobačaja.
5. Liječenje IVIG-om započeti što ranije, najbolje u vrijeme koncepcije.
6. IVIG primjenjivati do 12. tjedna ili samo tijekom jednog tjedna dati ukupnu dozu od 150 grama.

7. Tijekom obrade habitualnih pobačaja, određivati HLA-G na horijalnom tkivu u svrhu utvrđivanja izotipova HLA-G povezanih s pobačivanjem, te da li koncentracija HLA-G na horijalnom tkivu utječe na lokalnu imunospresiju.
8. Pri izboru parova za imunoterapiju HLA antigene određivati metodama DNA.
9. Serumske koncentracije TNF α i IL-2 nisu specifični parametri za procjenu ishoda trudnoće i eventualno blagotvornog djelovanja IVIG-a u odnosu na didrogesteron kod habitualnih pobačaja.
10. Niti u 1. niti u 2. periodu nema značajne razlike u serumskoj koncentraciji IL-2 i TNF α između dvije skupine trudnica habitualnih pobačaja (Wilcoxonov rank-sum test).
11. Srednja vrijednost TNF α u 1. periodu u habitualnih pobačaja (IVIG i kontrolna skupina) je 61,8 pg/ml što je statistički značajno više od 23,2 pg/ml u zdravih trudnica ($p=0,002$; Wilcoxonov rank-sum test).
12. Nema statistički značajne razlike u koncentraciji IL-2 u serumu zdravih trudnica u odnosu na trudnice habitualne pobačaje (IVIG i kontrolne skupine). Iako je srednja vrijednost koncentracije IL-2 u habitualnih pobačaja nešto veća nego u zdravih trudnica u 1. periodu (85,3 prema 73,7 pg/ml)

SAŽETAK

Habitualni ili učestali spontani pobačaji definiraju se kao tri ili više uzastopne trudnoće završene pobačajem. Imenuju se sekundarnim habitualnim pobačajima, ako im prethodi bar jedan porod živog djeteta, a primarnim habitualnim pobačajima kada su bez uspješno završene trudnoće. U približno 40% parova koji habitualno pobačaju nije nađen uzrok pobačivanja, te je vjerojatno određen broj tih pobačaja imunološki uzrokovan, iako nema patognomoničnih kliničkih ili laboratorijskih kriterija kojima bi se dokazali aloimunološki uzrokovani pobačaji.

U ispitivanje smo uključili 40 parova s iskustvom od tri i više uzastopnih spontanih pobačaja, prvog tromjesečja, kod kojih smo isključili anatomske, endokrinološke, metaboličke, upalne, autoimunosne i druge uzroke pobačivanja te pretpostavili vjerojatni aloimunološki uzrok pobačivanja (podudarnost u HLA-D antigenima).

Uz pismeni pristanak parova te uz odobrenje Etičkog povjerenstva KB»Mercur» i Medicinskog fakulteta uključili smo ih u ispitivanje.

Nakon utvrđivanja trudnoće ultrazvukom ili s pozitivnim β -lancom humanog horionskog gonadotropina, zadovoljavanja kriterija za izbor parova, proveli smo prospektivno kontrolirano randomizirano (tablica slučajnih brojeva) kliničko ispitivanje: 20 trudnica liječili smo IVIG-om, prva infuzija od 30 grama IVIG-a. Sljedećih pet/šest infuzija IVIG po 20 grama trudnice su dobile u razmacima od po tri tjedna sve do 22-24. tjedna trudnoće. Ukupna doza IVIG bila je 130/150 grama. Drugih 20 trudnica smo liječili uobičajnom intenzivnom skrbi-mirovanje, didrogesteron. Kod svih ispitanica postojala je podudarnost u HLA-D lokusima među partnerima. Eritrocitni i leukocitni antigeni ustanovljeni su u Centru za tipizaciju tkiva KBC Rebro u Zagrebu. Sve indikacije postavljene su u KB»Merkur».

Od 40 ispitanica uključenih u studiju tri su rodile u Splitu, jedna u Karlovcu, jedna u Bjelovaru.

Kao kriterije uspjeha terapije uzeli smo trudnoće i porode iznad 24. tjedna gestacije.

Kariotipovi svih pobačenih zametaka bili su uredni.

Ukupan broj pobačaja u IVIG skupini je 73, ili prosječno 3,63 po trudnici, dok je 60 u kontrolnoj skupini ili prosječno 3,0 po trudnici.

U skupini IVIG ispitanice su bile u dobi od 24 do 40 godina, a prosječna dob iznosila je 31,8 godina. Od 20 trudnica 17 je rodilo što je 85% (17/20). Tri trudnoće okončane su pobačajem u prvom tromjesečju, što je 15% (3/20). Broj živorođene djece iz 17 poroda je 19 (jedni trojci). Učestalost prijevremenog poroda je 17,64% (3/17porođenih). Carskim rezom zbog opstetričkih indikacija završeno je 10 poroda što je 58,82% (10/17). H-gestozu imale su 3 trudnice što je 17,64% (3/17 poroda). U 3 trudnice zbog prijetećeg prijevremenog poroda započeto je liječenje ritodrinom intravenski i per os (3/17). Serklaža je učinjena u 5 trudnica što je 29,41% (5/17) na broj poroda ili 25% ako se uzmu sve ispitanice (5/20). Manja za gestacijsku dob bila su 2 novorođenčeta. Srednja gestacijska dob pri porodu je 38,11 tjedana (od 29 do 41 tjedan). Srednja tjelesna težina novorođenčeta je 2863,2g (u rasponu od 400g do 3650g).

U kontrolnoj skupini ispitanice su bile u dobi 22 od 36 godina, prosječna dob bila je 29,7 godina. Od 20 trudnica 18 je rodilo, a 2 su pobacile. Stopa uspjeha je 90% (18/20). Broj živorođene djece iz 18 poroda je 19.

Prije navršenih 37. tjedna završile su 3 trudnoće ili 16,66% (3/18). Ritodrinom intravenski ili per os zbog prijetećeg pobačaja liječeno je 5 trudnica. Serklaža je učinjena u 6 ispitanica što je 33,33% (6/18 poroda) ili 30% ako su računaju sve ispitanice (6/20). Carskim rezom zbog opstetričkih indikacija dovršeno je 5 poroda ili 27,77% (5/18).

Srednja gestacijska dob pri porodu je 36,16 tjedana (od 26 do 41 tjedan). Srednja tjelesna težina novorođenčeta je 2925,8g (od 480 do 4350g).

Srednja vrijednost koncentracije TNF α i IL-2 u serumu IVIG/kontrole kroz sva tri promatrana perioda nisu pokazale statistički značajnu razliku.

Srednja vrijednost TNF α zdravih trudnica u 1. periodu je 23,2 pg/ml, dok je u habitualnih pobacilja 61,8 pg/ml (IVIG i kontrolnoj skupini). Statistički je

značajno viša koncentracija TNF α u serumu habitualnih pobačilja u odnosu na zdrave trudnice.

Ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji IL-2 u serumu zdravih trudnica u odnosu na habitualne pobačilje. Srednja vrijednost koncentracije IL2 u zdravih trudnica u 1. periodu je 73,66 pg/ml, a u habitualnih pobačilja 85,3 pg/ml (IVIG i kontrolna skupina).

Blage nuspojave pojavile su se u 6 trudnica koje su primale IVIG uvijek pri rimanju prve doze. To su glavobolja, mučnina, tresavica, osjećaj vrućine temperatura do 38° C i crvenilo kože. Smanjivanjem brzine infuzije simptomi su se povlačili.

SUMMARY

Habitual abortion or recurrent spontaneous abortion is defined as a sequence of three or more pregnancies ending as miscarriage; if such a series has been preceded by a normal, successful pregnancy, it is called "secondary habitual abortion", if not, the term "primary habitual abortion" is used. In approximately 40% of the habitual abortions no causative factor can be determined, in this group of patients an immunological rejection reaction is suspected, although at present no distinctive pathognomonic clinical or laboratory criteria are available to characterize this subgroup of habitual abortion.

Forty primary aborters enrolled in study to receive infusion humane intravenous immunoglobuline (IVIG) or didrogesteron tablet à 10 mg starting as soon as pregnancy test was positive.

The aim of this study was to present the results of the treatment and eventually evidence for therapeutic effect IVIG/didrogesteron in women who had suffered at least three recurrent miscarriage.

IVIg was first produced at the Institute of Immunology in Zagreb, Croatia. In this study, partners with histocompatibility in HLA-D loci were included. Tissue typing was carried out at the Tissue Typing Center, University Hospital Center Rebro, Zagreb. Before treatment at our hospital all the patients with the possibility of the chromosomal aberrations, genopathies, anatomic, microbiological, endocrinological, environmental factors or autoimmunization as a cause of abortion were excluded.

Treatment (IVIg/didrogesteron, bed rest) started after confirmation of pregnancy on the fifth week of pregnancy. First infusion contained 30 grams of IVIg. Further five/six doses of 20 grams were infused every third week. Total dose of IVIg was 130/150 grams per case. All pregnancies, except one, were treated at our hospital, but five women were gave birth out of our hospital. Success was defined as pregnancy beyond gestational week 24 and/or delivery.

In IVIg group:

Twenty women participated in study. Their average age was 31,8 years (range 24-40). Seventeen out of twenty pregnant women delivered 19 babies (one triplets). One pre-term at 28 weeks born baby died 3 hour after birth.

Three abortions occurred after the first or second infusion.

Due to obstetrics reasons ten deliveries were terminated by caesarean section (58,82%).

Three pregnancies were (17,64%) terminated before 37 gestation weeks. Two babies were born small for gestational age. Three patients developed H-gestosis. Three women had pre-term labor pain and were treated with infusion of ritodrin. Due to incompetence of cervix in 5 cases in second trimester of pregnancy cervical cerclage were done (29,41%)

In control group (bed rest, didrogesteron tablet à 10 mg until 12th weeks) the average age of women receiving didrogesteron was 27,9 years (range 22-36). Out of twenty, 18 pregnant women gave birth to 19 babies (one twins). Success rate was 90% (18/20). Twins were born at 26 weeks pre-term, and died several hours later. Three women had pre-term delivery (16,66%), in one of them caesarean section was done in 34th weeks of gestation due to worsening universal fetal hydrops. Baby was died 12 hours after delivery due to hydrops unknown etiology. Due to pre-term uterine contractions we treated five pregnant women with infusion of ritodrin. Due to incompetence of cervix in 6 cases in second trimester of pregnancy cervical cerclage was done (33,33%). Due to obstetrics reasons 5 deliveries were terminated by caesarean section (27,77%).

The average weight of the newborns was 2863,2g (range 400g-3650g) in the IVIg group and 2925,8g (range 480g-4350g) in didrogesteron group. The average gestational ages were 38,11 weeks (range 29-41) in the IVIg group and 36,16 weeks (range 26-41 weeks) in control groups. No congenital malformations were observed in the newborns.

In all, with no significant differences in the pregnancy course or perinatal outcome between those two-treatment group (IVIg/didrogesteron) were found. May be due to imunomodulatory effects of progesterone or emotional care

associated with administration of placebo can indirectly facilitating the progression of pregnancy.

Serum levels of TNF α and IL2 were not significantly associated with pregnancy outcome. We did not find statistical significant differentiation in serum concentration of TNF α and IL2 between IVIG group and control group. We found statistical significant elevation of serum concentration TNF α in first trimester pregnancy of women with history of at least 3 consecutive spontaneous abortions, in addition first trimester normal pregnancy

Only six patients in IVIG group had side effects at the time of the first infusion and they were: headache, nausea, chills, and elevated body temperature under 38° C, hot flushing, and chill. Side effects disappeared after reducing the speed of infusion.

LITERATURA

1. Škrablin-Kučić S, Kuvačić I. Spontani i ponavljani pobačaji U: Šimunić V i suradnici, ed: Ginekologija. Zagreb: Naklada Ljevak, 2001: 177-183
2. Sylvia Rosevear. Bleeding in early pregnancy. In: James DK, Steer PJ, Weiner CP, Gonik B, editors. High risk pregnancy management options. London: WB Saunders Company Ltd., 1994:75-100.
3. WHO. Recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Acta Obstet Gynecol Scand 1977; 56:247-253.
4. Edmonds DK, Lindsay KI, Miller JF. Early embryonic mortality in women. Fertil Steril 1982; 38:447-453.

5. Baines MG, Gendron RL. Natural and experimental animal models of reproductive failure. In: Chaouta G, editor. Immunology of pregnancy. Boca Raton: CRC Press, 1993:173-203.
6. Scott JR, Rote NS, Branch DW. Immunologic aspects of recurrent abortion and fetal death. *Obstet Gynecol* 1987; 70:645-656.
7. Stray-Pedersen B, Stray-Pedersen S. Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148:140-148.
8. Little AB. There's many a slip twixt implantation and the crib. *N Engl J Med* 1988; 319:241-242.
9. Rukavina D, Matejčić N, Cvitković P, Singer Z, Dražančić A. Imunologija oplodnje i trudnoće. U: Dekaris D, Čulo F, editori. Klinička imunologija u nas. Zagreb: Naprijed, 1990:479-491.
10. Miller JF, Williamson E, Glue J. Fetal loss after implantation. *Lancet* 1980; ii:554-556.
11. Hertz-Piccioto I, Samuels SJ. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1988; 319:1483-1484.
12. Regan L. A prospective study of spontaneous abortion. In: Beard RW, Sharp F, editors. Early pregnancy loss: Mechanisms and treatment. London: The Royal College of Obstetricians and Gynaecologist, 1988:23-27.
13. Bulletti C, Flamigni C, Giacomucci E. Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Hum Reprod update* 1996; 2:118-136.
14. Choudhury SR, Knapp LA. Human reproductive failure I: Immunological factors. *Hum Reprod Update* 2001; 7:113-134.
15. Singer Z, Profeta K, Podobnik M, Bulić M, Ciglar S, Kukura V, Smiljanć N. Uzroci i učestalost habitualnih pobačaja u našoj populaciji. *Genetika* 1989; 21:211-219.
16. Cowchock FS, Gibas Z, Jackson LG. Chromosome errors as cause of spontaneous abortion: the relative importance of maternal age and obstetrics history. *Fertil Steril* 1993; 59:1011.

17. Stern JJ, Dorfmann AD, Gutiérrez-Najar AJ, Cerrillo M, Coulam CB. Frequency of abnormal karyotypes among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. *Fertile Steril* 1996; 65:250-253.
18. Christiansen OB. A fresh look at causes and treatments of recurrent miscarriage, especially its immunological aspects. *Hum Reprod Update* 1996; 2:271-293.
19. Parazzini F, Acaia B, Ricciardiello O, Fedele L, Liati P, Candiani GB. Short-term reproductive prognosis when no cause can be found for recurrent miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol* 1988; 95:654-658.
20. Stirrat GM. Recurrent miscarriage I: definition and epidemiology. *Lancet* 1990; 336:673-675.
21. Boue A, Boue J, Gropp A. Cytogenetics of pregnancy wastage. *Adv Hum Genet* 1985;14:1-19.
22. Hill JA. Immunologic factors in recurrent spontaneous abortion. In: Kurpisz M, Fernandez N, editors. *Immunology of Human reproduction*. Oxford: BIOS Scientific, 1995:401-424.
23. Speroff L, Glass RH, Kase NG. Recurrent Early Pregnancy Losses. In: Speroff L, Glass RH, Kase NG, ed: *Clinical gynecologic endocrinology and infertility* 6th ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 1999:1043-1055.
24. Regan L, Braude PR, Trembath PL. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ J* 1989; 299:541-545.
25. Daya S, Gunby J, Clark DA. Intravenous Immunoglobulin Therapy for Recurrent Spontaneous Abortion: A Meta-Analysis. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39:69-76.
26. Clifford K, Rai R, Regan L. Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage. *Hum Reprod* 1997; 12:387-389
27. Zergollern-Čupak Lj. Sindromi i bolesna stanja vezana za kromosomske aberacije. U: Zergollern Lj, editor. *Humana genetika*. Zagreb: Medicinska naklada, 1994:468-498.

28. Olsen SB, Magenis RE. Cytogenetic aspects of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Endocrinol* 1988; 6:191-202.
29. Sachs ES, Jahoda MGJ, Van Hemel JO, Hoogbeem AJ, Sandkuyl LA. Chromosome studies of 500 couples with two or more abortions. *Obstet Gynecol* 1985; 65:375-378.
30. McDonough PG. The role of molecular mutation in recurrent euploidic abortion. *Semin Reprod Edocrinol* 1988; 6:155-161.
31. Radaković B. Urođene anomalije ženskih spolnih organa. U: Šimunić V i suradnici editor. *Ginekologija*. Zagreb: Naklada Ljevak, 2001:91-100.
32. Patton PE, Novy MJ. Reproductive potential of the anomalous uterus. *Semin Reprod Endocrinol* 1988; 6:217-233.
33. Grimbizis GF, Camus M, Tarlatzis BC, Bontis JN, Devroey. Clinical implications of uterine malformations and hysteroscopic treatment results. *Hum Reprod update* 2001; 7:161-174
34. Heinonen PK, Saarikoski S, Pystynen P. Reproductive performance of women with uterine anomalies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1982; 61:157-162.
35. Bennett MJ. Congenital abnormalities of the fundus. In: Bennett MJ, Edmonds DK. *Spontaneous and Recurrent Abortion*. Oxford: Blackwell scientific, 1987:109-129.
36. Green LK, Haris RE. Uterine anomalies. Frequency of diagnosis and associated obstetric complications. *Obstet Gynecol* 1976; 47:427.
37. Glass RH, Golbus MS. Habitual abortion. *Fertil Steril* 1978; 29:257.
38. Jennings CL. Temporary submucosal cerclage for cervical incompetence. Report of 48 cases. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 113:1097.
39. McDonald IA. Cervical cerclage. *Clin Obstet Gynecol* 1980; 7:461-679.
40. Podobnik M. Ultrasonography in the detection of cervical incompetency. *J Clin Ultrasound* 1988; 13:383.
41. Andersen HF, Frank H. Transvaginal and transabdominal ultrasonography of the uterine cervix during pregnancy. *J Clin Ultrasound* 1991; 19:77.

42. Day S, Ward S, Burrows E. Progesterone profiles in luteal phase defect cycles and outcome of progesterone treatment in patients with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:225-232.
43. Peters AJ, Colston Wentz A. Luteal Phase Inadequacy. *Semin Reprod Endocrinol* 1995; 13:162-171.
44. Fritz MA. Inadequate luteal function and recurrent abortion. *Semin Reprod Endocrinol* 1988; 6:129-143.
45. Sagle M, Bishop K, Ridley N. Recurrent early miscarriage and polycystic ovaries. *BMJ* 1988; 297:1027-1028.
46. Regan L, Owen EJ, Jacobs HS. Hypersecretion of luteinising hormone, infertility and miscarriage. *Lancet* 1990; 336:1141-1144.
47. Clifford K, Rai R, Watson H, Franks S, Regan I. Does suppressing luteinizing hormone secretion reduce the miscarriage rate: Results of a randomized trial. *Br Med J* 1996; 312:1508-1511.
48. Mills JL, Simpson JL, Driscoll SG. Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *N Engl J Med* 1988; 319:1617-1623.
49. Kalter H. Diabetes and spontaneous abortion. A historical review. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156:1243.
50. Mousa HA, Alfirević Z. Trombophilia and Adverse Pregnancy Outcome. *CMJ* 2001; 42:135-145.
51. Wouters MGAJ, Broers GHJ, Blom HJ, Trijbels FJM, Thomas CHMG, Borm GF, Steegers-Theunissen RPM, Eskes TKAB: Hyperhomocysteinemia: A risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril* 1993; 60:820-825.
52. Coulam CB, Clark DA, Beer AE, Kutteh WH, Silver R, Kwak J, Stephenson M. Current Clinical Options for Diagnosis and Treatment of Recurrent Spontaneous Abortion. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38:57-74.
53. Bryant HE, Love EJ. Video display terminal use and spontaneous abortion risk. *Int J Epidemiol* 1989; 18:132-138.

54. Schnorr TM, Grajewski BA, Hornung RW. Video display terminals and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med* 1991; 324:727-733.
55. Plećaš D, Marcus M, Plećaš D. Trudnoća u žena zaposlenih na Video-terminal jedinicama. *Jugosl Ginekol Perinatol* 1990; 30:157-159.
56. Hemminki K, Mutanen P, Saloneimi J. Spontaneous abortions in hospital staff engaged in sterilising instruments with chemical agents. *BMJ* 1982; 285:1461-1463.
57. Watts DH, Eschenback DA . Reproductive tract infections as cause of abortion and pre-term birth. *Semin Reprod Endocrinol* 1988; 6:203-215.
58. Rote NS, Ng A. Anti-phospholipid antibodies and the placenta. In: Kurpisz M, Fernandez N, editors. *Immunology of Human reproduction*. Oxford: BIOS Scientific, 1995:377-400.
59. D'Hooghe TM, Hill JA. Autoantibodies in endometriosis. In: Kurpisz M, Fernandez N, editors. *Immunology of Human reproduction*. Oxford: BIOS Scientific, 1995:133-162.
60. Reece EA, Gabrielli S, Cullen MT, Zheng XZ, Hobbins JC, Harris EN. Recurrent adverse pregnancy outcome and antiphospholipid antibodies. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163:162-169.
61. Kutteh WH, Rote NS, Silver R. Antiphospholipid antibodies and reproduction: the antiphospholipid antibody syndrome. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41:133-152.
62. Sherer Y, Shoenfeld Y. The antiphospholipid (Hughes') syndrome: an entity to be expanded. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41:113-116.
63. Lubb WF, Liggins GC. Role of lupus anticoagulant and autoimmunity in recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Endocrinol* 1988; 6:181-190.
64. Caruso A, De Carolis S, Di Simone N. Antiphospholipid antibodies in obstetrics: new complexities and sites of action. *Hum Reprod Update* 1999; 5:267-276.
65. Kutteh WH. Antiphospholipid antibodies and reproduction. *J Reprod Immunol* 1997; 35:151-171.

66. Clark AD. Alloimmunity and pregnancy loss. In: Gleicher N, ed. Principles and Practice of Medical Therapy in Pregnancy, 3rd edition. Stamford: Appleton and Lange, 1998; 511-521.
67. Branch DW, Silver RM, Blackwell JL, Reading JC, Scott JR. Outcome of treated pregnancies in women with antiphospholipid syndrome: An update of the Utah experience. *Obstet Gynecol* 1992; 80:614-620.
68. Lockshin MD, Druzin ML, Qamar T. Prednisone does not prevent recurrent fetal death in women with antiphospholipid antibody. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160:439-443.
69. Silver RM, Porter TF, van Leeuwen I, Jeng G, Scott JR, Branch DW. Anticardiolipin antibodies: clinical consequences of "low titers". *Obstet Gynecol* 1996; 87:494-500.
70. Harris EN, Spinnato JA. Should anticardiolipin tests be performed in otherwise healthy pregnant women? *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:1272-1277.
71. Lockwood CJ, Romero R, Feinburg RF. The prevalence and biologic significance of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in general obstetric population. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161:369-373.
72. Petri M, Golbus M, Anderson R. Antinuclear antibody, lupus anticoagulant, and anticardiolipin antibody in women with idiopathic habitual abortion. A controlled prospective study of 44 women. *Arthritis Rheum* 1987; 30:601-606.
73. Barbui T, Cortelazzo S, Galli M. Antiphospholipid antibodies in early repeated abortions: A case controlled study. *Fertil Steril* 1988; 50:589-592.
74. Parazzini F, Acaia B, Faden D. Antiphospholipid antibodies and recurrent abortion. *Obstet Gynecol* 1991; 77:854-858.
75. Parke AL, Wilson D, Maier D. The prevalence of antiphospholipid antibodies in women with recurrent spontaneous abortion, women with successful pregnancies, and women who have never been pregnant. *Arthritis Rheum* 1991; 34:1231-1235.
76. Out HJ, Bruinse HW, Christiaens GCML. Prevalence of antiphospholipid antibodies in patients with fetal loss. *Ann Rheum Dis* 1991; 50:553-557.

77. Rai RS, Regan L, Clifford K, Pickering W, Dave M, Mackie I, McNally T, Cohen H. Antiphospholipid antibodies and beta 2-glycoprotein-I in 500 women with recurrent miscarriage: results of a comprehensive screening approach. *Hum Reprod* 1995; 10:2001-2005.
78. Simpson JL, Carson SA, Chesney C, Conley MR, Metzger B, Aarons J, Holmes LB, Jovanovic-Peterson L, Knopp R, Mills JL. Lack of association between antiphospholipid antibodies and the first trimester spontaneous abortion: a prospective study of pregnancies detected within 21 days of conception. *Fertil Steril* 1998; 69:814-820.
79. Hornstein MD, Davis OK, Massey JB, Paulson RJ, Collins JA. Antiphospholipid antibodies and in vitro fertilization success: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2000; 73:330-333.
80. Oshiro BT, Silver RM, Scott JR, Yu H, Branch DW. Antiphospholipid antibodies and fetal death. *Obstet Gynecol* 1996; 87:489-493.
81. Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, Reynolds R, Boyle CC, Harris EN. Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol* 1985; 62:738-745.
82. Obringer AR, Rote NS, Walter A. Antiphospholipid antibody binding to bilayer-coated glass microspheres. *J Immunol Methods*. 1995; 185:81-93.
83. Exner T, Triplett DA, Taberner D, Machin SJ. Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants. SSC Subcommittee for the standardization of Lupus Anticoagulants. *Throm Haemost* 1991; 61:320-322.
84. Coulam CB. The role of antiphospholipid antibodies in reproduction: questions answered and raised at the 18th annual meeting of the American Society of reproductive Immunology. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41:1-4.
85. Branch DW, Scott JR, Kochenow NK, Hershegold E. Obstetric complications associated with the lupus anticoagulant. *N Engl J Med* 1985; 313:1322-1326.

86. Mennuti MT, Samuels P. Recurrent pregnancy loss. In: Garcia CR, Mastroianni L, Amelar RD, Dubin L. Current therapy of infertility-3. Toronto. Philadelphia: B.C.Decker Inc., 1988:123-128.
87. Branch DW. Antiphospholipid antibodies and reproductive outcome: the current state of affairs. *J Reprod Immunol* 1998; 38:75-87.
88. Topping J, Quenby S, Farquharson R, Malia R, Greaves M. Marked variation in antiphospholipid antibodies during pregnancy: relationships to pregnancy outcome. *Hum Reprod* 1999; 14:224-228.
89. Urry RL, Caudle MR, Rote NS. Autoimmune infertility and recurrent abortion. In: Scott JR, Rote NS, editors. *Immunology in obstetrics and gynecology*. East Norwalk: A publishing division of Prentice-Hall Inc., 1985:77-105.
90. Dimitrov DG, Urbanek V, Zverina J, Madar J, Nouza K, Kinsky R. Correlation of asthenozoospermia with increased antisperm cell-mediated immunity in men from infertile couples. *J Reprod Immunol* 1994; 27:3-12.
91. Mathur S, Williamson HO, Baker ME, Rust PF, Holtz GL, Fundenberg HH. Sperm motility on postcoital testing correlates with male autoimmunity to sperm. *Fertil Steril* 1984; 41:81-87.
92. Fann CH, Lee CYG. Monoclonal antibodies affecting sperm-zona binding and/or zona-induced acrosome reaction. *J Reprod Immunol* 1992; 21:175-187.
93. Naz RK. Effects of antisperm antibodies on early cleavage of fertilized ova. *Biol Reprod* 1992; 46:130-139.
94. Mahmoud A, Comhaire F. Antisperm antibodies: use of mixed agglutination reaction (MAR) test using latex beads. *Hum Reprod* 2000; 15:231-233.
95. Helmerhorst FM, Finken MJ, Erwich JJ. Antisperm antibodies: detection assays for antisperm antibodies: what do they test? *Hum Reprod* 1999; 14:1669-1671.
96. Cunningham DS, Fulgham DL, Rayl DL, Hansen KA, Alexander NJ. Antisperm antibodies to sperm surface antigens in women with genital tract infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164:791-796.

97. Mazumdar S, Levine AS. Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Fertil Steril* 1998; 70:799-810.
98. Mandelbaum SL, Diamond MP, DeCherney AH. The impact of antisperm antibodies on human infertility. *J Urol* 1987; 138:1-8.
99. Clarke GN, Baker HWG. Lack of association between sperm antibodies and recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 1993; 59:463-464.
100. Simpson JL, Carson SA, Mills JL, Conley MR, Aarons J, Holems LB, Jovanovic-Peterson L, Knopp R, Metzger B. Prospective study showing that antisperm antibodies are not associated with pregnancy losses. *Fertil Steril* 1996; 66:36-42.
101. Sargent IL, Redman CWG, Stirrat GM. Maternal CMSI in normal and pre-eclamptic pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1982; 50:601-609.
102. Sargent IL, Wilkins T, Redman CWG. Maternal immune responses to the fetus in early pregnancy and recurrent miscarriage. *Lancet* 1988; ii:1099-1103.
103. McIntyre JA. In search of trophoblast-lymphocyte cross reactive antigens. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988; 17:100-110.
104. Ho HN, Gill III TJ, Nsieh RP, Nsieh HJ, Lee TY. Sharing of human leukocyte antigens in primary and secondary recurrent spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163:178-188.
105. Gill TJ, Ho HN, Kanbour A, Macpherson TN, Misra DN, Kunz HW. Immunogenetic factors influencing the survival of the fetal allograft. In: Beard RW, Sharp F, editors. *Early pregnancy loss. Mechanisms and treatment*. London: The Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, 1988:277-286.
106. Christiansen OB, Rusom K, Lauritsen JG, Grunnet N. No increased histocompatibility antigen-sharing in couples with idiopathic habitual abortion. *Hum Reprod* 1989; 4:160-162.
107. Ober CL, Hanck WW, Kostyn DD. Adverse effects of human leukocyte antigen-DR sharing of fertility: A cohort study in a human isolate. *Fertil Steril* 1985; 44:227-332.

108. Christiansen OB. Intravenous Immunoglobulin in the Prevention of Recurrent Spontaneous Abortion: The European Experience. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39:77-81.
109. Bach JF. Organ-specific autoimmunity. *Immunol Today* 1995; 16:353-355.
110. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14:353-356.
111. Hill JA, Polgar K, Anderson DJ. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *JAMA* 1995; 273:1933-1936.
112. Čulo F. Organizacija imunološkog sustava. U: Andreis I i suradnici, editor. *Imunologija*. 5th ed. Zagreb: Medicinska naklada, 1998; 46-135
113. King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW. Human uterine lymphocytes. *Hum Reprod Update* 1998; 4:480-485.
114. Gilman-Sachs A, DuChateau BK, Aslakson CJ, Wolgemuth GP, Kwak JY, Bear AE, Beaman KD. Natural killer (NK) cell subsets and NK cell cytotoxicity in women with histories of recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41:99-105.
115. Watanabe M, Iwatani Y, Kaneda T, Hidaka Y, Mitsuda N, Morimoto Y, Amino N. Changes in T, B and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *Am. J Reprod Immunol* 1997; 37:368-377.
116. Kwak JY, Quilty EA, Gilman-Sachs A, Beaman KD, Beer AE. Intravenous immunoglobulin infusion therapy in women with recurrent spontaneous abortions of immune etiologies. *J Reprod Immunol* 1995; 28:175-88.
117. Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, Ogasawara M, Okada S, Yagami Y, Geicher N. Preconceptual natural killer cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 1995; 345:1340-1342.
118. Coulam CB, Goodman C, Roussev RG, Thomason EJ, Beaman KD. Systemic CD56⁺ cells can predict pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol* 1995; 33:40-46.
119. Kaštelan A. Imunogenetika. U: Zergollern LJ i suradnici, editor. *Humana genetika*. 3rd ed. Zagreb: Medicinska naklada, 1994:225-277.

120. Juretić A. Imunogenetika. U: Zergollern LJ i suradnici, editor. Medicinska genetika 2. Zagreb: Školska knjiga, 1994:359-397.
121. Le Bouteiller P. HLA-G: On the track of immunological functions. *Eur J Immunogenetics* 1997; 24:397-408.
122. Carosella ED, Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. *Immunol Today* 1999; 20:60-62.
123. Loke YW, Hiby S, King A. Human Leukocyte antigen-G and reproduction. *J Reprod Immunol* 1999; 43:235-245.
124. Loke YW, King A. Decidual natural-killer-cell interaction with trophoblast: cytolysis or cytokine production? *Biochem Soc Transact* 2000; 28:196-198.
125. Goldman-Wohl DS, Ariel I, Greenfield C, Hochner-Celnikier D, Cross J, Fisher S, Yagel S. Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblast is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:88-95.
126. Goldman-Wohl DS, Ariel I, Greenfield C, Hanoch J, Yagel S. HLA-G expression in extravillous trophoblasts is an intrinsic property of cell differentiation: a lesson learned from ectopic pregnancies. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:535-40.
127. Goldman-Wohl D, Ariel I, Greenfield C, Hochner-Celnikier D, Lavy Y, Yagel S. A study of human leukocyte antigen G expression in hydatiform moles. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185:476-480.
128. Fuji T, Ishitani A, Geraghty DE. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol* 1994; 153:5516
129. Chu W, Fant ME, Geraghty DE, Hunt JS. Soluble HLA-G in human placentas: synthesis in trophoblasts and interferon-gamma-activated macrophages but not placental fibroblast. *Hum Immunol* 1998; 59, 435-442.
130. Fernandez N, Cooper J, Sprinks M, Abdelrahman D, Fiszer M, Kurpisz M, Dealtry G. A critical review of the role of the major histocompatibility complex in fertilization, preimplantation development and feto-maternal interactions. *Hum Reprod Update* 1999; 5:234-248.

131. Jurisicova A, Casper RF, MacLusky NJ, Mills GB, Librach CL. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:161-165.
132. Le Bouteiller P, Lenfant F. Antigen-presenting function(s) of the non-classical HLA-E, -F, and -G class I molecules: the beginning of a story. *Res Immunol* 1996; 147:301-313.
133. King A, Hiby SE, Gardner L, Joseph S, Bowen JM, Verma S, Burrows TD, Loke YW. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors- a review. *Placenta* 2000; 21:581-583.
134. Ober C, Hyslop T, Elias S, Weitkamp LR, Hauck WW. Human leukocyte antigen matching and fetal loss: results of 10-year prospective study. *Hum Reprod* 1998; 13:33-38.
135. Ober C. Studies of HLA, fertility and mate choice in a human isolate. *Hum Reprod Update* 1999; 5:103-107.
136. Humar I. Odnos infertilnosti i genoma fetusa u ljudi. (Magistarski rad). Zagreb: Postdiplomski studij prirodnih znanosti Biologija, 1992.
137. Institute of Immunology Zagreb, Croatia. Human immunoglobulin. *Catalog* 1994;4,3.
138. Tanner JM, Thompson AM. Standards for birth-weight at gestation periods from 32 to 42 weeks allowing for maternal height and weight. *Arch Dis Child* 1970; 45:566-575.
139. Medawar PB. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol* 1953; 7:320-323.
140. Rukavina D. Imunologija trudnoće i perinatalne dobi. U: Kurjak A, i suradnici, editor. *Ginekologija i perinatologija*, 2nd ed. 2. svezak. Varaždinske Toplice: Golden Time, 1995:91-99.
141. Le Bouteiller P, Solier C, Pröll J, Aguerre-Girr M, Fournel S, Lenfant F. Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? *Hum Reprod update* 1999; 5:223-233.
142. Chaouat G. Immunoregulatory placental function in normal and pathological pregnancies. *Am J Immunol Microbiol* 1988; 17:18-21.

143. Kurjak A, Zudenigo D. Doplerska mjerenja majčinog i fetalnog krvotoka. Kurjak A, i suradnici. Ginekologija i perinatologija, 2nd ed. 2.svezak. Varaždinske Toplice: Golden Time, 1995:73-89.
144. Faulk WP, Sanderson AR, Temple A. Distribution of MHC antigens in human placental villi. *Transplant Proc* 1977; 9:1379-1384.
145. Sunderland CA, Nalem M, Mason DY, Redman CW, Stirrat GM. The expression of major histocompatibility antigens by the human chorionic villi. *J Reprod Immunol* 1981; 3:323-31.
146. Thelin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-placental “graft”: ten ways to support a child for nine month. *Cur Opin Immunol* 2000; 12:731-737.
147. O’Neil C. Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos in vitro. *Biol Reprod* 1998; 58:1303-1309.
148. Barnea RE, Choi JY, Leavis CP. Embryo-maternal signaling prior to implantation. *Early Preg.:Biol and Med.*2000; 4:166-175.
149. Morton H, Rolfe BE, Clunie GJA, Anderson MJ, Morrison J. An early pregnancy factor detected in human serum by rosette inhibition test. *Lancet* 1977; 1:394-397.
150. Clarke FM. Does “EPF” have identity? *J Assist Reprod Genet* 1997; 14:489-491.
151. Cavanagh AC. An update on the identity of early pregnancy factor and its role in early pregnancy. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14:492-494.
152. Witkin SS. Immunology of pregnancy and spontaneous abortion. In: Charles D, Glover DD, editors. *Current Therapy in obstetrics*. Toronto-Philadelphia: B.C. Decker Inc., 1988:138-142.
153. Plećaš D, Šulović V. Imunološki odnos majka-plod. U: Šulović V, editor. *Patologija trudnoće*. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga, 1989:92-105.
154. Houlihan JM, Birfo PA, Harper HM, Jenkinson HJ, Holmes CH. The human amnion is a site of MHC class Ib expression: evidence for the expression of HLA-E and HLA-G. *J Immunol* 1995; 154:5665-74.

155. van der Ven K, Ober C. HLA-G polymorphisms in African Americans. *J Immunol* 1994; 153:5628-33.
156. Christiansen OB, Mathiesen O, Lauritsen JG, Grunnet N. Intravenous immunoglobulin treatment of women with multiple miscarriages. *Hum Reprod* 1992; 7:718-722.
157. Tichenor JR, Bledsoe LB, Opsahl MS, Cunningham DS. Activation of complement in human with a first-trimester pregnancy loss. *Gynecol Obstet Invest* 1995; 39:79-82.
158. Davies M. An ELISA for the detection of maternal anti trophoblast antibodies in human pregnancy. *J Reprod Meth* 1985; 7:109-118.
159. McIntyre JA, Faulk WP. Allotypic trophoblast lymphocyte cross reactive (TLX) cell surface antigens. *Hum Immunol* 1982; 4:27-35.
160. Hamilton TA, Wada HG, Sussman HN. Expression of human placental cell surface antigens on peripheral blood lymphocytes and lymphoblastoid cell lines. *Scand J Immunol* 1980; 11:195-201.
161. Jalali GR, Rezai A, Underwood JL, Mowbray JF, SurrIDGE SH, Allen WR, Matthias S. An 80-kDa syncytiotrophoblast alloantigen bound to maternal alloantibody in term placenta. *Am J Reprod Immunol* 1995; 33:213-220.
162. Tedesco F, Pausa M, Nardon E, Narchi G, Bulla R, Livi C, Guaschino S, Meroni Pl. Prevalence and biological effects of anti-trophoblast and anti-endothelial cell antibodies in patients with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38:205-211.
163. Adorini L, Guéry JC, Rodriguez-Tarduchy G, Trembleau S. Selective immunosuppression. *Immunol Today* 1993; 14:285-9.
164. Saji F. Late trophoblast immunoregulatory factors. In Chaouat G editor. *Immunology of Pregnancy*. Florida: Telford BRC Press, 1993:125-141.
165. Lea RG, Underwood J, Flanders KC, Hirte H, Banwatt D, Finotto S, Ohno I, Daya S, Harley C, Michel M. A subset of patients with recurrent spontaneous abortion is deficient in transforming growth factor β -2-producing "suppressor cells" in uterine tissue near the placental attachment site. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34:52-64.

166. Markert UR, Chaouat G. Preliminary characterization of an immunosuppressive inducer factor secreted by the JEG-3 choriocarcinoma cell line: In vitro and in vivo studies. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38:327-338.
167. Daya S. Habitual abortion. In: Copeland L.J., ed. *Textbook of gynecology* 2nd edition. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000; .227-271.
168. Arici A, Engini O, Attar E, Olive DL. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1908-15.
169. Bischof P, Haenggeli I, Campana A. Effect of leukemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34:225-230.
170. Dunglison GF, Barlow DH, Sargent IL. Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Hum Reprod* 1996; 11:191-196.
171. Sharkey AM, King A, Clark DE, Burrows TD, Jokhi PP, Charnock-Jones DS, Loke YW, Smith SK. Localisation of leukemia Inhibitory Factor and Its Receptor in Human Placenta Throughout pregnancy. *Biol Reprod* 1999; 60:355-364.
172. Hambartsoumian E. Leukemia inhibitory factor (LIF) production by human deciduas and its relations with pregnancy hormones. *Gynecol Endocrinol* 1998; 12:17-22.
173. Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushing and production by cells in culture. *Hum Reprod* 1997; 12:569-574.
174. Aplin JD. Adhaesions molecules in implantation. *Rev Reprod* 1997; 2; 84-93.
175. Suzuki N, Zara J, Sato T, Ong E, Bakhiet N, Oshima RG, Watson KL, Fukuda MN. A cytoplasmic protein, bystin, interacts with trophinin, tastin, and cytokeratin and may be involved in trophinin-mediated cell adhesion

- between trophoblast and endometrial epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:5027-5032.
176. Fukuda MN, Sato T, Nakayama J, Klier G, Mikami M, Aoki D, Nozawa S. Trophinin and tasin a novel cell adhesion molecule complex with potential involvement in embryo implantation. *Genes Dev* 1995; 9:1199-1210.
177. Marušić M. Fiziološki tijek imunološke reakcije. U: Andreis I i suradnici editor. *Imunologija*. 5th ed. Zagreb: Medicinska naklada, 1998; 221-248
178. Vinatier D. Integrins and reproduction. *Contracept fertile Sex* 1995; 23:327-334.
179. Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest* 1992; 89:210-220.
180. Bowen JA, Hunt JS. The role of integrins in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 223:331-343.
181. Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* 1992; 90:188-195.
182. Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Sun J. Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril* 1995; 63:535-542.
183. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. Human cytotrophoblast adopts a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?. *J Clin Invest* 1997; 99:2139-2151.
184. Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Ann Rev Physiol* 1995; 57:607-634.
185. Hilkens J, Ligtenberg MJ, Vos HL, Litvinov SV. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends Biochem Sci* 1992; 17:359-363.

186. Aplin JD, Hey NA, Li TC. MUC1 as a cell surface and secretory component of endometrial epithelium: reduced levels in recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35:261-266.
187. Aplin JD, Seif MW, Graham RA, Hey NA, Behzad F, Campbell S. The endometrial cell surface and implantation. Expression of the polymorphic mucin MUC-1 and adhesion molecules during the endometrial cycle. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 734:103-121.
188. Aplin JD, Meseguer M, Simón C, Ortiz ME, Croxatto H, Jones CJ. MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo. *Biochem Soc Trans* 2001; 29:153-156.
189. Serle E, Aplin JD, Li TC, Warren MA, Graham RA, Seif MW, Cooke ID. Endometrial differentiation in the peri-implantation phase of women with recurrent miscarriage: a morphological and immunohistochemical study. *Fertil Steril* 1994; 62:989-996.
190. Hey NA, Li TC, Devine PL, Graam RA, Saravelos H, Aplin JD. MUC1 in secretory phase endometrium: expression in precisely dated biopsies and flushings from normal and recurrent miscarriage patients. *Hum reprod* 1995; 10:2655-2662.
191. Hill JA. Preface. In: Hill JA editor. *Cytokines in Human Reproduction*. New York: Wiley-Liss, 2000; ix
192. Ober C, Karrison T, Odem RR, Barnes RB, Branch DW, Stephenson MD, Baron B, Walker MA, Scott JR, Schreiber JR. Mononuclear-cell immunization in prevention of recurrent miscarriages: a randomized trial. *Lancet* 1999; 354: 365-369.
193. Best CL, Hill JA. Cytokines in ovarian function. In: Hill JA, editor. *Cytokines in Human Reproduction*. New York: Wiley-Liss, 2000; 43-77.
194. Hales DB. Cytokines and testicular function. In: Hill JA, editor. *Cytokines in Human Reproduction*. New York: Wiley-Liss, 2000; 17-42.
195. Cheigini N, Williams RS. Cytokines and growths factor networks in human endometrium from menstruation to embryo implantation. In: Hill JA, editor. *Cytokines in Human Reproduction*. New York: Wiley-Liss, 2000; 93-132.

196. Hill JA. Cytokines in early pregnancy success and failure. In: Hill JA, editor. Cytokines in Human Reproduction. New York: Wiley-Liss, 2000; 161-169
197. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. Immunol Today 1997; 18:478-482.
198. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol today 1996; 17:138-146.
199. Tranchot-Diallo J, Gras G, Parnet-Mathieu F, Benveniste O, Marcé D, Roques P, Milliez J, Chaouat G, Dormont D. Modulations of cytokine expression in pregnant women. Am J Reprod Immunol 1997; 37:215-226.
200. Reinhard G, Noll A, Schlebusch H, Mallman P, Ruecker AV. Shifts in the TH1/Th2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. Biochem Biophys Res Commun 1998; 245:933-938.
201. Schust DJ, Hill JA. Correlation of serum cytokine and adhesion molecule determinations with pregnancy outcome. J Soc Gynecol Invest 1996; 3:259-261.
202. Mallman P, Mallman R, Krebs D. Determination of tumor necrosis factor alpha and interleukin 2 in women with idiopathic recurrent miscarriage. Arch Gynecol Obstet 1991; 249:73-78.
203. Shaarawy M, Nagui AR. Enhanced expression of cytokines may play a fundamental role in the mechanisms of immunologically mediated recurrent spontaneous abortion. Acta Obstet Gynecol Scand 1997; 76:205-211.
204. Palfi M, Jablonovska B, Matthiesen L, Ernerudh J. Circulating interferon-gamma and interleukin-4-secreting cells in recurrent spontaneous abortions. Am J Reprod Immunol 1999; 41:257-63.
205. MacLean MA, Wilson R, Jenkins C, Miller H, Walker JJ. Interleukin-2 receptor concentrations in pregnant women with a history of recurrent miscarriage. Hum Reprod 2002; 17:219-220.
206. Lim KJ, Odukoya OA, Ajjan RA, Li TC, Weetman AP, Cooke ID. Profile of cytokine mRNA expression in peri implantation human endometrium. Mol Hum Reprod 1998; 4:77-81.

207. Okada S, Okada H, Sanezumi M, Nakajima T, Yasuda K, Kanzaki H. Expression of interleukin-15 in human endometrium and decidua. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:75-80.
208. Bennett WA, Lagoo-Deenadayalan S, Whitworth NS, Stopple JA, Barber WH, Hale E, Brackin MN, Cowan BD. First-trimester human chorionic villi express both immunoregulatory and inflammatory cytokines: a role for interleukin-10 in regulating the cytokine network of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41:70-78.
209. Piccinni MP, Romagnani S. Regulation of fetal allograft survival by a hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines. *Immunol Res* 1996; 15:141-150.
210. Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann TG, Guilbert LJ. Cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 1994; 15:819-835.
211. Hill JA, Haimovici F, Anderson DJ. Products of activated lymphocytes and macrophages inhibit mouse embryo development in vitro. *J Immunol* 1987; 139:2250-2254.
212. Hashii K, Fujiwara H, Yoshioka S, Kataoka N, Yamada S, Hirano T, Mori T, Fujii S, Maeda M. Peripheral blood mononuclear cells stimulate progesterone production by luteal cells derived from pregnant and non pregnant women: possible involvement of interleukin-4 and interleukin-10 in corpus luteum function and differentiation. *Hum Reprod* 1998; 13:2738-2744.
213. Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M, Al-Shamali E. Maternal Th1 and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell Immunol* 1999; 196:122-130.
214. Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000; 15:713-718.

215. Maggi E, Del Prete G, Macchia D, Parronchi P, Tiri A, Chrétien I, Ricci M, Romagnani S. Profiles of lymphokine activities and helper function for IgE in human T cell clones. *Eur J Immunol* 1988; 18:1045-50.
216. Kelso A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol Today* 1995; 16:374-379.
217. Singal DP, Buttler L, Liao SK, Joseph S. The fetus as an allograft: evidence for antiidiotypic antibodies induced by pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1984; 6:145-151.
218. Neppert J, Mueller-Eckhardt G, Neumeyer H, malchus R, Kiefel V, Gerhard I, Kuhn U, Westphal E, Harpprecht J. Pregnancy-maintaining antibodies: workshop report (Giessen, 1988). *J Reprod Immunol* 1989; 15:159-167.
219. Taylor C, Faulk WP. Prevention of recurrent abortion with leukocyte transfusions. *Lancet* 1981; ii:68-70.
220. Mowbray JF, Lidell H, Underwood JL, Gibbings C, Reginald PW, Beard RW. Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunization with paternal cells. *Lancet* 1985; ii:941-943.
221. Regan L, Braude PR. Is antipaternal cytotoxic antibody a valid marker in the management of recurrent abortion? *Lancet* 1987; 2:1280.
222. Starkey PM, Clover LM, Rees MC. Variation during the menstrual cycle of immune cell populations in human endometrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991; 39:203-207
223. Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Roy DC. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *J Immunol* 1996; 156:4027-4034.
224. Quenby S, Bates M, Doig T, Brewster J, Lewis-Jones DJ, Johnson PM, Vince G. Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1999; 14:2386-2391.
225. Vassiliadou N, Bulmer JN. Quantitative analysis of T lymphocyte subsets in pregnant and nonpregnant human endometrium. *Biol Reprod* 1996; 55:1017-1022.

226. Arck PC, Ferrick DA, Steele-Norwood D, EganPJ, Croitoru K, Carding SR, Dietl J, Clark DA. Murine T cell determination of pregnancy outcome. *Cell Immunol* 1999; 196:71-79.
227. Hayday AC, Barber DF, Douglas N, Hoffman ES. Signals involved in gamma/delta T cell versus alpha/beta T cell lineage commitment. *Semin Immunol* 1999; 11:239-249.
228. Mingari MC, Vitale C, Cambiaggi A, Schiavetti F, Melioli G, Ferrini S, Poggi A. Cytolytic T lymphocytes displaying natural killer (NK)-like activity: expression of NK-related functional receptors for HLA class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on the TCR-mediated target cell lysis or lymphokine production. *Int Immunol* 1995; 7:697-703.
229. Daya S, Clark DA, Devlin C, Jarell J, Chaput A. Suppressor cells in human decidua. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 151:267-270.
230. Matsui S, Yoshimura N, Oka T. Characterization and analysis of soluble suppressor factor from early human decidual cells. *Transplantation* 1989; 47:678-83.
231. King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update* 2000; 6:28-36.
232. Bulmer JN, Morrison N, Longfellow M, Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 1991; 6:791-798.
233. King A, Balendran N, Wooding P, Carter NP, Loke YW. CD3- leukocytes present in the human uterus during early placentation: phenotypic and morphologic characterization of the CD56+ population. *Dev Immunol* 1991; 1:169-190.
234. King A, Gardner I, Loke YW. Co-stimulation of human decidual natural killer cells by interleukin-2 and stromal cells. *Hum Reprod* 1999; 14:656-663.
235. Lea RG, Underwood J, Flanders KC, Hirte H, Banwatt D, Finotto S, Ohno I, Daya S, Harley C, Michel M. a subset of patients with recurrent spontaneous abortion is deficient in transforming growth factor beta-2-

- producing “suppressor cells” in uterine tissue near the placental attachment site. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34:52-64.
236. Vassiliadou N, Bulmer JN. Immunohistochemical evidence for increased numbers of “classic” CD57+ natural killer cells in the endometrium of women suffering spontaneous early pregnancy loss. *Hum Reprod* 1996; 11:1569-1574.
237. Kwak JYH, Kwak FMY, Abinder SW. Elevated peripheral blood natural killer cells are effectively down regulated by immunoglobulin G infusion in women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35:363-369.
238. Wegmann TG. Placental immunotrophism: The idea and the evidence. In: Chaouat G, editor. *The immunology of the fetus*. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1990:180-185.
239. Stephenson MD, Dreher K, Houlihan E, Wu V. Prevention of Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion Using Intravenous Immunoglobulin: A Prospective, Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39:82-88.
240. Beer AE, Quebbeman JF, Ayers JWT, Haines RF. Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 141:987-99.
241. Johnson PM, Chia KV, Hart CA, Griffith HB, Francis WA. Trophoblast membrane infusion for unexplained recurrent miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol* 1988; 95:342-347.
242. Reznikoff-Etievant MF, Durieux I, Huchet J, Salmon C, Netter A. Paternal leucocyte injections in recurrent spontaneous abortion. *Lancet* 1987; ii:1460.
243. Unander AM. The role of immunization treatment in preventing recurrent abortion. *Transfus Med Rev* 1992; 6:1-16.
244. Mowbray JF, Underwood JL, Michel M, Forbes PB, Beard RW. Immunization with paternal lymphocytes in women with recurrent miscarriage. *Lancet* 1987; i:679-680.

245. Unander AM, Lindholm A. Transfusions of leukocyte-rich erythrocyte concentrates: A successful treatment in selected cases of habitual abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154:516-20
246. Taylor CG, Faulk WP, McIntyre JA. Prevention of recurrent spontaneous abortions by leukocyte transfusions. *J R Soc Med* 1985; 78:623-627.
247. Gatenby PA, Cameron K, Simes RJ, Adelstein S, Bennet MJ, Jansen RPS, Shearman RP, Stewart GJ, Whittle M, Doran TJ. Treatment of recurrent spontaneous abortion by immunization with paternal lymphocytes: Results of controlled trial. *Am J Reprod Immunol* 1993; 29:88-94.
248. Cauchi MN, Lim D, Young DE, Kloss M, Pepperell RJ. Treatment of recurrent aborters by immunization with paternal cells-Controlled trial. *Am J Reprod Immunol* 1990; 25:16-17.
249. Ho HN, Gill III TJ, Hsieh HJ, Jiang JJ, Lee TY, Hsieh CY. Immunotherapy for recurrent spontaneous abortions in Chinese population. *Am J Reprod Immunol* 1991; 25:10-15.
250. Coulam CB, Coulam CH. Update on immunotherapy for recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 1992; 27:124-127.
251. Daya S, Gunby J. The Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialist Group: The Effectiveness of allogeneic leukocyte immunization in unexplained primary recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1994; 323:294-302.
252. Coulam CB, Clark DA. Controversies in Diagnosis and management of Recurrent Spontaneous Abortion. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37:279-282.
253. Thomas ML, Harger JH, Wagener DK, Rabin BS, Gill III TJ. HLA sharing and spontaneous abortion in humans. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 151:1053-58.
254. Gerencer M, Kastelan A, Drazancic A, Kerhin-Brkljacic V, Madjaric M. The HLA antigens in women with recurrent abnormal pregnancies of unknown etiology. *Tissue Antigens* 1978; 12:223-227.
255. Gerencer M, Drazancic A, Kuvacic I, Tomaskovic M, Kastelan A. HLA antigen studies in women with recurrent gestational disorders. *Fertil Steril* 1979; 31:401-404.

256. Gerencer M, Singer Z, Pfeifer S, Tomaskovic M, Humar I, Mezulic V, Kuvacic cI, Zepic L, Kastelan A. HLA and blood group antigens in pregnancy disorders. *Tissue Antigens* 1988; 32:130-138.
257. Coulam CB, Moore SB, O' Fallon WM. Association between major histocompatibility antigens and reproductive performance. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987; 14:54-58.
258. Komlos L, Zamir R, Joshua H, Halbrecht I. Common HLA antigens in couples with repeated abortions. *Clin Immunol Immunopathol* 1977; 7:330-335.
259. Oksenberg JR, Persitz E, Amar A, Brautbar C. Maternal-paternal histocompatibility: lack of association with habitual abortions. *Fertil Steril* 1984; 42:389-395.
260. Lauritsen JG, Kristensen T, Grunnet N. Depressed mixed lymphocyte culture reactivity in mothers with recurrent spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 125:3539.
261. Johnson PM, Barnes RMR, Risk JM, Molloy CM, Woodrow JC. Immunogenetic studies of recurrent spontaneous abortions in humans. *Exp Clin Immunogenet* 1985; 2:77-83.
262. Jazwinska EC, Kilpatrick DC, Smart GE, Liston WA. Feto-maternal HLA compatibility does not have a mayor influence on human pregnancy except for lymphocytotoxin production. *Clin Exp Immunol* 1987; 68:116-122.
263. The Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialist Group. Worldwide collaborative observational study and meta-analysis on allogenic leukocyte immunotherapy for recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1994; 32:55-72.
264. Gerenčer M, Kaštelan A. The Role of HLA-D region in feto-maternal interactions. *Transplant Proc* 1983; 15:893-895.
265. Smith JB, Cowchock FS, Hankinson B, Iftekhhar A. Association of HLA-DR5 with recurrent spontaneous abortion in women treated with paternal leukocytes. Possible sub clinical autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 1989; 32:1572-1576.

266. Reznikoff-Etievant MF, Edelman P, Muller JY, Pinon F, Sureau C. HLA-DR locus and maternal-fetal relation. *Tissue Antigens* 1984; 24:30-34.
267. Christiansen OB, Rasmussen KL, Jersild C, Grunnet N. HLA class II alleles confer susceptibility to recurrent fetal losses in Danish women. *Tissue Antigens* 1994; 44:225-233.
268. Christiansen OB, Mathiesen O, Husth M, Lauritsen JG, Jersild C, Grunnet N. Prognostic significance of maternal DR histocompatibility types in Danish women with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 1993; 8:1843-1847.
269. Christiansen OB, Andersen HH, Højbjerg M, Kruse TA, Lauritzen SL, Grunnet N. Maternal HLA Class II allophenotypes are markers for the predisposition to fetal losses in families of women with unexplained recurrent fetal loss. *Eur J Immunogenet* 1995; 22:323-334.
270. Christiansen OB, Ring M, Rosgaard A, Grunnet N, Gluud C. Association between HLA-DR1 and -DR3 antigens and unexplained repeated miscarriage. *Hum Reprod Update* 1999; 5:249-255.
271. Christiansen OB, Ulcova-Gallova Z, Mohapelova H, Krauz V. Studies on associations between human leukocyte antigen (HLA) class II alleles and antiphospholipid antibodies in Danish and Czech women with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 1998; 13:3326-3331.
272. Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Mölvig J, Worsaae H, Abbal M, Thomsen M, Nerup J, Cambon-Thomsen A. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- α and TNF- β by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993; 23:224-231
273. Mueller-Eckhardt G, Mallmann P, Neppert J, Lattermann A, Melk A, Heine O, Pfeiffer R, Zingsem J, Domke N, Mohr-Pennert A. Immunogenetic and serological investigations in non pregnant and in pregnant women with a history of recurrent spontaneous abortions. German RSA/IVIG Study Group. *J Reprod Immunol* 1994; 27:95-109.

274. Karhukorpi J, Laitinen T, Tiilikainen AS. HLA-G polymorphism in Finnish couples with recurrent spontaneous miscarriages. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104:1212-1214.
275. Yamashita T, Fuji T, Tokunaga K, Tadokoro K, Hamai Y, Miki A, Kozuma S, Juji T, Taketani Y. Analysis of human leukocyte antigen-G polymorphism including intron 4 in Japanese couples with habitual abortion. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41:159-163.
276. Aldrich CL, Stephenson MD, Karrison T, Odem RR, Branch DW, Scott JR, Schreiner JR, Ober C. HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:1167-72.
277. Pfeiffer KA, Fimmers R, Engels G, van der Ven H, van der Ven K. The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:373-8.
278. Pfeiffer KA, Sillem M, Daniel V, Kirschfink M, Süsal C, Runnebaum B, Gerhard I. Activated autologous blood therapy in recurrent spontaneous abortion-results of a pilot study. *Hum Reprod* 1998; 13:491-497.
279. Johnson PM, Ramseden GH. A combined randomized double blind and open study of trophoblast membrane infusion (TMI) in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1991; 25:50.
280. Stray-Pedersen B, Stray-Pedersen S. Recurrent abortion: the role of psychotherapy. In: Beard RW, Sharp F. *Early pregnancy loss Mechanisms and treatment*. London: The Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, 1988:433-439.
281. Bergant AM, Reinstadler K, Moncayo HE, Sölder E, Heim K, Ulmer H, Hinterhuber H, Dapunt O. Spontaneous abortion and psychosomatics. A prospective study on the impact of psychological factors as a cause for recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 1997; 12:1106-1110.
282. Carp HJA, Toder V, Mashiach S. Immunotherapy of habitual abortion. *Am J Reprod Immunol* 1992; 28:281-284.
283. Hwang JL, Ho HN, Yang YS, Hsieh CY, Lee TY, Gill III TJ. The role of blocking factors and antipaternal lymphocytotoxic antibodies in the success

- of pregnancy in patients with recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 1992; 58:691-696.
284. Neppert J, Clemens M, Mueller-Eckhardt C. Immune phagocytosis inhibition by commercial immunoglobulins. *Blut* 1986; 52:67-72.
285. Newland AC. Annotation. The use and mechanisms of action of intravenous immunoglobulin: An update. *Br J Haematol* 1989; 72:301-305.
286. Berkman SA, Lee ML, Gale RP. Clinical uses of intravenous immunoglobulins. *Semin Hematol* 1988; 25:140-158.
287. Imbach P, d'Apuzzo V, Hirt A, Rossi E, Vest M, Barandun S, Baumgartner C, Morella A, Schoni M, Wagner HP. High-dose intravenous gamma globulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet* 1981; i:228-232.
288. Delfraissy JF, Tchernia G, Laurian Y, Wallon C, Galanaud P, Dormont J. Suppressor cell function after intravenous gamma globulin treatment in adult idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1985; 60:315-322.
289. Bulles JB, Pham LC, Aledort L, Nahman R. Maintenance treatment of adults with chronic refractory immune thrombocytopenic purpura using repeated intravenous infusions of gammaglobulin. *Blood* 1988; 72:121-127.
290. McVerry BY, Spearing R, Smith A. SLE anticoagulant: Transient inhibition by high dose immunoglobulin infusions. *Br J Haematol* 1985; 61:579-80.
291. Carreras LO, Perez GH, Yega HR, Casavilla F. Lupus anticoagulant and recurrent fetal loss: successful treatment with gammaglobulin. *Lancet* 1988; ii:393-394.
292. Tchernia G, Dreyfus M, Laurian Y, Derycke M, Mirica C, Kerbrat G. Management of immune thrombocytopenia in pregnancy: response to infusions of immunoglobulins. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148:225-226.
293. Marzusch K, Wiest W, Pfeiffer KH, Grubber G, Schnaidt M. Antenatal fetal therapy for neonatal allo-immune thrombocytopenia with high dose immunoglobulin. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101:1011-13.
294. Bjornsson S, Brennand JE, Calder AA, Lumley SP, Manson L, Todd AAM, Murphy WG, Ludlam CY. Unexplained hemolytic anemia in successive

- pregnancies with negative direct antiglobulin test and response to high dose IV IgG. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101:75-77.
295. de la Camara C, Arrieta R, Gonzales A, Iglesias E, Omenaca F. High dose intravenous immunoglobulin as sole prenatal treatment for severe Rh immunization (letter). *N Engl J Med* 1988; 318:519-20.
296. Alonso JG, Decaro J, Marrero A, Lavalle E, Martell M, Cuadro JC. Repeated direct fetal intravascular high dose immunoglobulin therapy for the treatment of Rh-hemolytic disease. *J Perinat Med* 1994; 22:415-419.
297. Nydegger UE, Sturzenegger M. Adverse effects of intravenous immunoglobulin therapy. *Drug Saf* 1999 21; 171-185.
298. Mueller-Eckhardt G, Heine O, Neppert J, Kunzel W, Mueller-Eckhardt C. Prevention of recurrent spontaneous abortion by intravenous immunoglobulin. *Vox Sang* 1989; 56:151-154.
299. Mueller-Eckhardt G, Heine O, Polten B. IVIG to prevent recurrent spontaneous abortion. *Lancet*. 1991; 337:424-425.
300. Heine O, Mueller-Eckhardt G. Intravenous immune globulin in recurrent abortion. *Clin Exp Immunol* 1994; 97:39-42.
301. Heilmann L, Kriechbaum A, Hojnacki B, Bode V, Wolf H. Klinische erfahrungen mit der passiven immunotherapie beim wiederholten abort. *Geburtshilfe Perinatol* 1993; 197:55-58.
302. Stricker RB, Steinleitner A, Bookoff CN, Weckstein LN, Winger EE. Successful treatment of immunologic abortion with low-dose intravenous immunoglobulin. *Fertil Steril* 2000; 73:536-40.
303. The Germani RSA/IVIG group. Intravenous immunoglobulin in the prevention of recurrent miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol*.
304. Coulam CB, Krysa L, Stern J, Bustillo M. Intravenous Immunoglobulin for treatment of Recurrent Pregnancy Loss. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34:333-337.
305. Christiansen OB, Mathiesen O, Husth M, Rasmussen KL, Ingerslev HJ, Lauritsen JG, Grunnet N. Placebo-controlled trial of treatment of unexplained secondary recurrent spontaneous abortion and recurrent late

- spontaneous abortions with intravenous immunoglobulin. *Hum Reprod* 1995; 10:2690-2695.
306. Perino A, Vassiliadis A, Vucetich A, Colacurci N, Menato G, Cignitti M, Semprini AE. Short-term therapy for recurrent abortion using intravenous immunoglobulins: results of double-blind placebo-controlled Italian study. *Hum Reprod* 1997; 12:2388-2392.
307. Jablonovska B, Selbing A, Palfi M, Ernerudh J, Kjellberg S, Lindton B. Prevention of recurrent spontaneous abortion by intravenous immunoglobulin: a double blind placebo-controlled study. *Hum Reprod* 1999; 14:838-841.
308. Daya S, Gunby J, Porterr F, Scott J, Clark DA. Critical analysis of intravenous immunoglobulin therapy for recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 1999; 5:475-482.
309. Christiansen OB, Pedersen B, Rosgaard A, Husth M. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intravenous immunoglobulin in the prevention of recurrent miscarriage: evidence for a therapeutic effect in women with secondary recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2002; 17:809-816.
310. Yamada H, Kishida T, Kobayashi N, Kato EH, Hoshi N, Fujimoto S. Massive immunoglobulin treatment in women with four or more recurrent spontaneous primary abortions of unexplained etiology. *Hum Reprod* 1998; 13:2620-2623.
311. Grosse-Wilde H, Blasczyk R, Westhoff U. Soluble HLA class I and class II concentrations in commercial immunoglobulin preparations. *Tissue Antigens* 1992; 39:74-77.
312. Santoso S, Kiefel V, Volz H, Mueller-Eckhardt C. Quantitation of soluble HLA class I antigen in human albumin and immunoglobulin preparations for intravenous use by solid-phase immunoassay. *Vox Sang* 1992; 62:29-33.
313. Nydegger UK. Hypothetic and established action mechanisms of therapy with immunoglobulin G. In: Imbach P, ed: *Immunotherapy with intravenous immunoglobulins*. Academic Press, 1991.

314. Basta M, Kirshbom P, Frank MM, Fries LF. Mechanism of therapeutic effect of high-dose intravenous immunoglobuline. *J Clin Invest* 1989; 84:1974-81.
315. Kimberly RP, Salmon JE, Bussel JS, Crow MK, Hilgartner MW. Modulation of mononuclear phagocyte function by intravenous gamaglobulin. *J Immunol* 1984; 132:745-750.
316. Mannhalter JW, Ahmad R, Wolf HM, Eible MM. Effect of polymeric IgG on human monocyte functions. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82:159-167.
317. Sultan Y, Maisonneuve P, Kazatchkine MD, Nydegger UE. Antiidiotypic suppression of autoantibodies of factor VIII by high dose intravenous gammaglobulin. *Lancet* 1984; i:765-768.
318. Tsubakio T, Kurato Y, Katagers S. Alteration of T cell subset and immunoglobulin synthesis in vitro during high dose gammaglobulin therapy in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Clin Exp Immunol* 1983; 53:697-702.
319. Scott JR, Branch W, Kochenour NK, Ward K. Intravenous immunoglobulin treatment of pregnant patients with recurrent pregnancy loss caused by antiphospholipid antibodies and Rh immunization. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159:1055-1056.
320. Beer AE, Kwak-Kim JYH. Intravenous Immunoglobulin G (IVIG): Dream or reality?. *Clinical Application of Immunological Investigation* 2001; 1:69-74.

TABLICA 3. Klinički podaci kontrolne skupine

<i>R. br.</i>	<i>Inicijali (dob)</i>	<i>Porod</i>	<i>Broj pobačaja</i>	<i>Početak Th: (hbd)</i>	<i>Druga terapija</i>	<i>Komplikacije trudnoće</i>		<i>Porod/Ab</i>	<i>Tjed.</i>	<i>TT/duž.</i>	<i>Spol</i>
1.	H.M. (27)	0	3	6	cerclage, ritodrin	PPI, Inkomp. cervik.	Vag	porod	40	3300/49	žensko
2.	D.T. (35)	0	3	5			Vag	porod	39	4350/56	muško
3.	B.L. (27)	0	3	6			Vag	porod	40	3030/47	žensko
4.	R.M. (28)	0	3	7	cerclage	Inkomp.cervik.		porod	40	3700/50	žensko
5.	De V.D. (30).	0	3	5	cerclage	Inkomp.cervik	Vag	porod	25+2	530/29 480/30	muško žensko
6.	Š.B. (26)	0	3	6				ab	8+2		46.XX
7.	M.I. (31)	0	3	5	ritodrin	PPI, universalni hidrops ploda u 34 tj.	c. rez	porod	34	2600/47	žensko
8.	P.M. (36)	0	3	6	cerclage	Inkomp. cervic.	Vag	porod	39	3500/49	muško
9.	R.R.(24)	0	3	5	ritodrin	PPI	Vag	porod	38	2700/50	muško
10.	D.T.D. (33)	0	3	5	ritodrin	PPI	Vag	porod	36+6	2650/48	muško
11.	R.I. (33)	0	3	6			Vag	porod	39+6	3500/50	žensko
12.	P-S. (35)	0	3	6				ab	11+5		Split
13.	N.Lj. (35)	0	3	6	ritodrin	PPI. IUGR	Vag	porod	39+2	2500/49	žensko
14.	G.N. (24)	0	3	5			Vag	porod	39+3	3400/52	muško
15.	V.Ž. (31)	0	3	5	cerclage	Inkomp. cervik.	c. rez	porod	38+1	3000/49	muško
16.	P.M. (24)	0	3	6			c. re	porod	38	3500/53	muško
17.	V.L.I. (28)	0	3	6	cerclage	Inkomp. cervik.	c. rez	porod	40+1	3200/51	muško
18.	O.A. (22)	0	3	5			c. rez	porod	40+1	3200/51	muško
19.	M.S. (30)	0	3	6			Vag	porod	39	3500/52	muško
20.	P.N. (34)	0	3	6			Vag	porod	38+3	2950/50	muško

TABLICA 2. Klinički podaci IVIG skupine

R. br.	Inicijali (dob)	Porod	Broj Ab.	Početak Th (hbd)	br cikl.	Druga terapija	Komplikacije trudnoće		Ishod trudnoće			
									Po-rod/Ab	Tjed.	TT/duž.	Spol
1.	V.R. (30)	0	4	5	7			vag	porod	39+5	3500/10	muško
2.	K.L. (33)	0	3	7	6	Cordipin, ritodrin	H gestosis, IUGR, PPI	vag	porod	38+1	2800/50	žensko
3.	M.P. (27)	0	3	7	3				ab	13+2	Missed ab.	46,xx
4.	B.D. (37)	0	2	6	6	da	H gestosis, eklampsija, IUGR	c. rez	porod	28+3	400/25	muško
5.	V.M. (24)	0	3	7	7	cerclage.	Inkom. cervik, zadak	c. rez	porod	41	3430/54	žensko
6.	Z.A. (27)	0	3	6	7			vag	porod	39	3150/50	žensko
7.	K.I. (40)	0	4	5	7	Metildopa, antibiotika, cerclage, ritodrin	H-gestosis, PPI, PPROM od 25. tj., inkomp. cervik.	vag	porod	34	2020/44	žensko
8.	M.Č.V. (37)	0	3	5	1				ab	8	Missed ab.	46 XX
9.	P.B.(37)	0	5	4	7	cerclage, ritodrin	Inkomp. cervik., PPI	c. rez	porod	33+4	2450/49 1800/46 1650/42	muško muško muško
10.	G.V. (36)	0	3	5	7		.	c. rez	porod	39+5	3350/48	žensko
11.	M.M.(38)	0	3	6	6			c. rez	porod	40+2	3350/50	žensko
12.	F.M. (30)	0	5	5	2				ab	8+1	Missed ab	46,xx
13.	R.D. (36)	0	4	5	7	cerclage	Inkomp.cervik., IUGR	c. rez	porod	39+4	2700/50	žensko
14.	M.I. (34)	1	7	6	6			c. rez	porod	38	2700/50	muško
15.	K.E. (34)	0	4	6	6			c. rez	porod	38	3100/49	žensko
16.	G.K. (25)	0	3	4	7			vag	porod	38+1	3450/50	muško
17.	P.S. (32)	0	4	5	7	cerclage	Inkomp. cervik.	c. rez	porod	38+1	3200/51	muško
18.	S.A. (27)	0	3	5	7			vag	porod	38+4	3200/50	žensko
19.	H.I. (27)	0	3	5	7			c. rez	porod	39	3350/50	žensko
20.	K.Š.M. (25)	0	4	6	7			vag	porod	38+6	3050/50	žensko

TABLICA 5. Podudarnost partnera u HLA antigenima; IVIG skupina

R. broj	Inicijali	HLA - A	HLA - B	HLA - DR	HLA - DQ
1.	V.R	2		52	1, 3
2.	K.L.		35	1	1
3.	M.P.	2			1, 3
4.	B.D.				1, 2
5.	V.M.	1		1	1,
6.	Z.A.		5	52	3
7.	K.I.			52	
8.	M.Č.V.	3			3
9.	P.B.		35		1, 3
10.	G.V.	2	35	1	1
11.	M.M.			2,11, 52	1, 3
12.	F.M.	2			1, 3
13.	R.D.	2		52	
14.	M.I.				1, 3
15.	K.E.	2		11, 52	
16.	G.K.	2		1	1
17.	P.S.	9		3	2
18.	S.A.	9	35	3	
19.	H.I.			4	3
20.	K.Š.M.			2	1, 3

TABLICA 4. Nuspojave za vrijeme davanja IVIG-a

<i>R. br.</i>	<i>Inicijali</i>	<i>GLAVOBOLJA</i>	<i>CRVENILO KOŽE</i>	<i>POVRAĆANJE I MUČNINA</i>	<i>OSJEĆAJ VRUĆINE</i>	<i>TRESAVICA</i>	<i>TEMP DO 38° C</i>
1.	B.D.		+		+		
2.	M.V.	+					
3.	P.B.	+				+	
4.	M.I.	+					+
5.	G.K.	+		+			
6.	K.Š.M			+			

TABLICA 1. Kriteriji za izbor parova

1. Sukladnost partnera u HLA-D lokusima
2. Parovi s tri i više spontanih pobačaja koji su uslijedili uzastopno s istim partnerom
3. Isključeni su kromosomski, anatomski, mikrobiološki, endokrinološki i autoimunosni uzroci infertiliteta
4. Isključene su genopatije pomoću podataka iz heredograma
5. Isključeni vanjski nepogodni utjecaji (pušenje, alkohol, fizikalni i kemijski teratogeni)
6. Kod ranije pobačenog zametka/ploda nađen je uredan kariotip
7. Krvna slika žene je uredna.

TABLICA 5.a Podudarnost partnera u HLA antigenima; Kontrolna skupina

R. broj	Inicijali	HLA - A	HLA - B	HLA - DR	HLA - DQ
1.	H.M.	1	8	52	
2.	D.T.	2		1	1
3.	B.L.			2	1
4.	R.M.		7	2	1
5.	De V.D.			7, 53	2
6.	Š.B.				1, 2
7.	M.I.	3		52	1
8.	P.M.			2	1
9.	R.R..		5	11, 52	1, 3
10.	D.T.D.			52	1, 3
11.	R.I.			1	1
12.	P-S.			4, 52, 53	3
13.	N.Lj.		21, 22	52	
14.	G.N.	2			2
15.	V.Ž.			6, 52	1
16.	P.M.	2		1	1
17.	V.L.I.			3, 52	2
18.	O.A.	1		51	1
19.	M.S.			11, 52	3
20.	P.N.			11, 52	3

Tablica 6

	IVIG		Kontrolna s.		p*
	N	%	N	%	
Sprema					
NSS	0	0,0	1	5,0	NS
SSS	12	60,0	11	55,0	
VŠS	0	0,0	1	5,0	
VSS	8	40,0	7	35,0	
Krvna grupa					
O	6	31,6	6	30,0	NS
A	7	36,8	7	35,0	
B	5	26,3	2	10,0	
AB	1	5,3	5	25,0	
Rh faktor					
-	1	5,3	3	15,0	NS
+	18	94,7	17	85,0	
Sprema supruga					
SSS	11	55,0	11	55,0	NS
VŠS	1	5,0	1	5,0	
VSS	8	40,0	8	40,0	
Krvna grupa supruga					
O	5	35,7	8	44,4	NS
A	5	35,7	2	11,1	
B	3	21,4	5	27,8	
AB	1	7,1	3	16,7	
Rh faktor supruga					
-	3	21,4	0	0,0	NS
+	11	78,6	18	100,0	
P					
0	19	95,0	20	100,0	NS
1	1	5,0	0	0,0	
AB					
2	1	5,0	0	0,0	0,0004
3	10	50,0	20	100,0	
4	6	30,0	0	0,0	
5	2	10,0	0	0,0	
7	1	5,0	0	0,0	
Gornja granica duljine krvarenja					
4	2	10,0	0	0,0	NS
5	11	55,0	16	80,0	
6	6	30,0	4	20,0	
8	1	5,0	0	0,0	

Tablica 6 (nastavak)

	IVIG		Kontrolna s.		p*
	N	%	N	%	
Početak					
imunoterapije					
4	2	10,0			
5	9	45,0			
6	6	30,0			
7	3	15,0			
Završetak					
imunoterapije					
5	1	5,0			
8	1	5,0			
13	1	5,0			
21	1	5,0			
22	1	5,0			
23	8	40,0			
24	7	35,0			
Broj ciklusa imunoterapije					
1	1	5,0			
2	1	5,0			
3	1	5,0			
6	5	25,0			
7	12	60,0			
Nuspojave					
Nema	9	60,0			
Ima	6	40,0			
Cerclage					
Ne	15	75,0	14	70,0	NS
Da	5	25,0	6	30,0	
Prepar					
Ne	17	85,0	15	75,0	NS
Da	3	15,0	5	25,0	
Ishod					
Porod	17	85,0	18	90,0	NS
Pobačaj	3	15,0	2	10,0	
Spol					
Ženski	11	57,9	7	36,8	NS
Muški	8	42,1	12	63,2	
Spol ¹					
Ženski	11	68,8	6	35,3	NS
Muški	5	31,3	11	64,7	
Način					
Vag.	7	41,2	13	72,2	NS
C. Rez.	10	58,8	5	27,8	
Porod naknadno					
Ne	16	80,0	10	50,0	NS
Da	4	20,0	10	50,0	
Abortus naknadno					
Ne	16	80,0	17	85,0	NS
Da	4	20,0	3	15,0	

¹ Bez višeplođnih trudnoća

NS -nesignifikantno

* p vrijednost χ^2 - testa, odnosno Fisherovog egzaktnog test:

Tablica 5 b. HLA status

	IVIG		Kontrolna s.		p*
	N	%	N	%	
DR1					
Ne	15	75,0	16	80,0	NS
Da	5	25,0	4	20,0	
DR3					
Ne	17	85,0	16	80,0	NS
Da	3	15,0	4	20,0	
DR1 i DR3					
Ne	20	100,0	19	95,0	NS
Da	0	0,0	1	5,0	
DR1 ili DR3					
Ne	12	60,0	13	65,0	NS
Da	8	40,0	7	35,0	
DQ1					
Ne	5	25,0	8	40,0	NS
Da	15	75,0	12	60,0	
DQ3					
Ne	11	55,0	10	50,0	NS
Da	9	45,0	10	50,0	
DQ1 i DQ3					
Ne	14	70,0	16	80,0	NS
Da	6	30,0	4	20,0	
DQ1 ili DQ3					
Ne	2	10,0	2	10,0	NS
Da	18	90,0	18	90,0	

* p vrijednost χ^2 - testa, odnosno Fisherovog egzaktnog test:
 NS- nesigifikantno

Tablica 7

	IVIG						Kontrolna s.						p*
	N	Sr.vr.	St.d.	Med.	Min.	Max.	N	Sr.vr.	St.d.	Med.	Min.	Max.	
Starost	20	31,8	5,1	32,5	24,0	40,0	20	29,7	4,3	30,0	22,0	36,0	NS
AB	20	3,7	1,1	3,0	2,0	7,0	20	3,0	0,0	3,0	3,0	3,0	0,004
Donja granica duljine ciklusa	20	28,1	1,7	28,0	24,0	32,0	20	29,0	1,8	28,0	28,0	35,5	NS
Gornja granica duljine krvarenja	20	5,4	0,9	5,0	4,0	8,0	20	5,2	0,4	5,0	5,0	6,0	NS
Početak imunoterapije u tjednu	20	5,5	0,9	5,0	4,0	7,0							
Završetak imunoterapije u tjednu	20	21,1	5,5	23,0	5,0	24,0							
Broj ciklusa imunoterapije	20	6,0	1,8	7,0	1,0	7,0							
Porodna težina	19	2863,2	742,1	3100,0	400,0	3650,0	19	2925,8	960,8	3200,0	480,0	4350,0	NS
Porodna težina ¹	16	2940,6	787,6	3175,0	400,0	3650,0	17	3210,6	468,7	3200,0	2500,0	4350,0	NS
Porodna dužina	19	48,5	6,0	50,0	25,0	54,0	19	48,0	6,9	50,0	29,0	56,0	NS
Porodna dužina ¹	16	48,4	6,6	50,0	25,0	54,0	17	50,2	2,2	50,0	47,0	56,0	NS
Tjedan poroda	20	33,6	10,7	38,1	8,0	41,0	20	35,2	9,3	39,0	8,3	40,1	NS
Tjelesna težina	20	68,8	10,2	70,0	52,0	90,0	20	71,7	9,3	72,0	50,0	90,0	NS
Dobitak u TT	16	15,2	2,9	15,5	8,0	20,0	19	16,1	3,4	16,0	10,0	22,0	NS
Tjelesna visina	20	163,7	5,8	162,0	155,0	180,0	20	165,9	5,3	165,0	159,0	180,0	NS

¹ Težina i dužina novorođenčadi bez višeplođnih trudnoća

* p vrijednost Wilcoxonovog rank-sum testa.

NS - nesignifikantno

Tablica 8 Citokini u serumu ispitanica

	Zdrave		IVIG					Kontrolna s.					p*		
	N	Sr.vr.	N	Sr.vr.	St.d.	Med.	Min.	Max.	N	Sr.vr.	St.d.	Med.		Min.	Max.
IL-2 1. period	4	73,66	10	85,9	122,8	51,1	0,1	397,4	8	84,6	120,4	40,1	0,2	348,2	NS
IL-2 2. period	2	20,81	11	70,0	109,2	32,1	0,1	373,8	8	83,4	114,2	46,5	0,2	340,9	NS
IL-2 3. period	2	35,8	1	83,9	---	83,9	83,9	83,9	1	75,0	---	75,0	75,0	75,0	
IL-2 Puerpere	2	49,1													
TNF- α 1. period	4	23,2	10	58,8	17,7	54,8	27,2	89,9	8	65,7	27,1	64,1	26,2	119,8	NS
TNF- α 2. period	2	16,1	11	59,3	15,6	59,0	27,9	85,0	7	58,1	15,6	59,9	34,0	83,4	NS
TNF- α 3. period	2	13,78	1	62,1	---	62,1	62,1	62,1	1	55,1	---	55,1	55,1	55,1	
TNF- α Puerpere	2	15,41													

* p vrijednost Wilcoxonovog rank-sum testa.

NS - nesignifikantno

1. period: 4-12. tjedna

2. period: 13-24. tjedna

3. period: 25-36. tjedna

Tablica 8a Citokini serumu ispitanica

	IVIG i kontrolna s.						Zdrave						p*
	N	Sr.vr.	St.d.	Med.	Min.	Max.	N	Sr.vr.	St.d.	Med.	Min.	Max.	
IL-2 1. period	18	85,3	118,1	40,1	0,1	397,4	4	73,7	30,6	72,9	38,1	110,7	NS
TNF- α 1. period	18	61,8	21,9	57,9	26,2	119,8	4	23,2	1,3	22,9	22,1	24,9	0,002

* p vrijednost Wilcoxonovog rank-sum testa.

NS - nesignifikantno

Tablica 8b Ispitanice s koncentracijom IL-2 > 2.4 pg/ml i TNF α > 12 pg/ml

	IVIG		Kontrolna s.		p*
	N	%	N	%	
IL-2 1. period					
< 2.4	4	40,0	2	25,0	NS
>= 2.4	6	60,0	6	75,0	
IL-2 2. period					
< 2.4	4	36,4	2	25,0	NS
>= 2.4	7	63,6	6	75,0	
TNF- α 1. period					
>= 12	10	100,0	8	100,0	
TNF- α 2. period					
>= 12	11	100,0	7	100,0	

* p vrijednost Fisherovog egzaktnog testa.

NS - nesignifikantno

Tablica 8c Citokini u serumu ispitanica

	Zdrave		IVIG		Kontrolna s.		Pobačaj
	N	Sr.vr.	N	Sr.vr.	N	Sr.vr.	Sr.vr.
IL-2 1. period	4	73,7	10	85,9	8	84,6	0,1
IL-2 2. period	2	20,8	11	70,0	8	83,4	0,1
IL-2 3. period	2	35,8	1	83,9	1	75,0	
IL-2 Puerpere	2	49,1					
TNF- α 1. period	4	23,2	10	58,8	8	65,7	27,2
TNF- α 2. period	2	16,1	11	59,3	7	58,1	27,9
TNF- α 3. period	2	13,8	1	62,1	1	55,1	
TNF- α Puerpere	2	15,4					

Tablica 9

	Spearmanov koeficijent korelacije	p*
IL-2	0,95666	<0.0001
TNF- α	0,62010	0,0079

Tablica 5 Nuspojave

Pacijentica	Tresavica	Glavobolja	Mučnina	Temperatura do 38C	Crvenilo kože	Osjećaj vrućine
Branka_Perić	+	+				
Katarina_Granić		+	+			
Matovina_Ivanka		+		+		
Dragica_Bistricki					+	+
Valentina_Majcug		+				
Kustor_Štetić_Magdalena			+			