

# Moguća uloga interleukina-16, -17 i -18 na fetoplacentnoj površini u miša

---

Ostojić, Saša

Doctoral thesis / Disertacija

2003

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:188:652879>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-01**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)





SVEUČILIŠTE U RIJECI - MEDICINSKI FAKULTET

www.medicinski-fakultet.hr

Saša Ostojić

# MOGUĆA ULOGA INTERLEUKINA-16, -17 I -18 NA FETOPLACENTNOJ POVRŠINI U MIŠA

Doktorska disertacija

Rijeka, 2003.

## S A D R Ź A J

|   | str.      |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD (PRIKAZ PODRUČJA)</b> .....  | 1         |
| 1.1. Općenito o imunologiji trudnoće.....   | 1         |
| 1.2. Genske i kromosomske abnormalnosti kao uzrok učestalih spontanih pobačaja..                          | 2         |
| 1.3. Imunološka obilježja fetoplacentne površine.....   | 2         |
| 1.3.1. Imunološka obilježja trofoblasta.....  | 3         |
| 1.3.2. Imunološka obilježja decidue.....  | 7         |
| 1.3.2.1. Decidualne stanice NK(dLGL).....   | 8         |
| 1.3.2.1.1. Izražavanje perforina u dLGL i njegova uloga u reprodukciji.....                               | 10        |
| 1.3.2.1.2. Uloga citokina u perforinom posredovanoj regulaciji citolitičke aktivnosti dLGL-a.....         | 11        |
| 1.3.2.2. Uterine stanice NK u miša (GMG).....   | 13        |
| 1.3.2.3. NK-stanični receptori u miša.....  | 13        |
| 1.3.2.4. Decidualni makrofazi.....  | 15        |
| 1.4. Citokini.....  | 16        |
| 1.4.1. Citokinski receptori.....  | 17        |
| 1.4.2. Uloga citokina u trudnoći .....  | 17        |
| 1.4.2.1. Th- citokinski obrasci tijekom trudnoće.....   | 18        |
| 1.4.3. Interleukin-16 (IL-16).....  | 21        |
| 1.4.4. Interleukin-17 (IL-17).....  | 23        |
| 1.4.5. Interleukin-18 (IL-18).....  | 24        |
| 1.5. Proces implantacije u miša.....  | 30        |
| 1.5.1. Stadiji implantacije u miša.....   | 30        |
| 1.5.1.1. Preimplantacijsko razdoblje (stadij slobodne blastociste) .....                                  | 30        |
| 1.5.1.2. Periimplantacijsko razdoblje (prijanjanje blastociste i nametanje trofoblastnom invazijom) ..... | 31        |
| 1.5.1.3. Postimplantacijsko razdoblje (placentacija).....   | 31        |
| 1.6. Korištenje CBA/JxDBA/2 križanaca za proučavanje trudnoće.....  | 36        |
| <b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b>   | <b>39</b> |

|  |    |
|--|----|
| <b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....   | 40 |
| 3.1. Uređaji.....  | 40 |
| 3.2. Kemikalije.....   | 40 |
| 3.3. Medij za uzgoj stanica.....   | 41 |
| 3.4. Monoklonska protutijela i poliklonski serumi.....   | 41 |
| 3.5. Početnice (primeri) .....   | 41 |
| 3.6. Komercijalni Kit-ovi.....   | 42 |
| 3.7. Laboratorijski materijali i posuđe.....   | 42 |
| 3.8. Laboratorijske životinje.....   | 42 |
| 3.9. Disekcija uzoraka i kriosekcija.....  | 43 |
| 3.10. Priprema briseva limfocitne stanične otopine miša (cytofuge) .....   | 43 |
| 3.11. Indirektna imunoenzimatska metoda s avidinsko-biotinskim sustavom za pojačanje signala.....                  | 44 |
| 3.12. Imunocitokemijsko obilježavanje decidualnih stanica NK Dolichos Biflorus (DBA) lektinom.....                 | 45 |
| 3.13. Indirektna imunoenzimatska metoda s sustavom za pojačanje signala pomoću molekula dekstranskog polimera..... | 45 |
| 3.14. Kultiviranje stanica decidua i placenti.....   | 46 |
| 3.15. "Sandwich" ELISA imunoenzimatska metoda.....   | 47 |
| 3.16. Priprema uzoraka za molekularne metode.....  | 48 |
| 3.17. Izolacija ukupne RNA.....  | 48 |
| 3.18. Reverzna transkripcija mRNA u komplementarnu DNA (cDNA) lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR).....          | 49 |
| 3.19. Semi-kvantitativna ekspresija mRNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR).....                                  | 50 |
| 3.20. Kvantitativna ekspresija mRNA lančanom reakcijom polimeraze - <i>LightCycler System</i> .....                | 52 |
| 3.21. Statistička obrada podataka.....   | 53 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>4. REZULTATI</b> .....  | 54  |
| 4.1. Ekspresija IL-16 proteina na fetoplacentnoj površini tijekom implantacijskog razdoblja trudnoće.....        | 56  |
| 4.2. Ekspresija IL-17 proteina na fetoplacentnoj površini tijekom implantacijskog razdoblja trudnoće.....        | 58  |
| 4.3. Ekspresija IL-18 proteina na fetoplacentnoj površini tijekom implantacijskog razdoblja trudnoće.....        | 60  |
| 4.4. Koncentracija IL-17 proteina u supernatantu kultiviranih decidua i placenti.....                            | 64  |
| 4.5. Koncentracija IL-18 proteina u supernatantu kultiviranih decidua i placenti.....                            | 65  |
| 4.6. Ekspresija IL-16 mRNA na fetoplacentnoj površini tijekom kasnog postimplantacijskog razdoblja trudnoće..... | 66  |
| 4.7. Ekspresija IL-18 mRNA na fetoplacentnoj površini tijekom kasnog postimplantacijskog razdoblja trudnoće..... | 68  |
| <b>5. RASPRAVA</b> .....   | 71  |
| <b>6. ZAKLJUČAK</b> .....  | 84  |
| <b>7. LITERATURA</b> .....   | 85  |
| <b>8. ŽIVOTOPIS</b> .....  | 121 |

## SAŽETAK

**CILJ ISTRAŽIVANJA:** Istraživanje moguće regulacijske uloge IL-16, IL-17, i IL-18 u trudnoći utvrđivanjem njihove ekspresije na fetoplacentnoj površini miša tijekom implantacijskog razdoblja u singeničnim i alogeničnim (normalnim i resorptivnim) kombinacijama križanja.

**MATERIJALI I METODE:** Korišteni su uzorci tkiva fetoplacentne jedinice BALB/c i CBA/J ženki miša. Ekspresija IL-16, IL-17 i IL-18 utvrđena je imunohistokemijski, dok su razine IL-17 i IL-18 u supernatantu kultiviranih stanica decidua i placenta kvantificirane ELISA imunoenzimatskom metodom. Imunocitokemijskom metodom, pomoću dolichos biflorus (DBA) lektina, specifično smo obilježili uterine NK stanice (uNK). Ekspresiju glasničke RNA za IL-16 utvrdili smo semi-kvantitativno lančanom reakcijom polimeraze (PCR), dok smo ekspresiju glasničke RNA za IL-18 kvantificirali PCR reakcijom u realnom vremenu (RT-PCR), korištenjem *LightCycler* sustava.

**REZULTATI:** Korištenjem imunohistokemijskih metoda utvrđena je slaba ekspresija IL-16 i IL-17 te jaka ekspresija IL-18, u decidualiziranoj stromi uterusa tijekom implantacijskog razdoblja trudnoće. Tijekom 9,5-10,5 dana trudnoće, na implantacijskom mjestu (decidua basalis) pronašli smo kratkotrajnu, jaku ekspresiju IL-18 u stanicama NK (uNK). Široka distribucija IL-18 u decidui tijekom implantacijskog razdoblja trudnoće, kao i kratkotrajna jaka ekspresija u uNK, ukazuje na moguću regulacijsku ulogu IL-18 tijekom rane trudnoće. Rezultati dobijeni ELISA-om pokazali su da je produkcija IL-18 bila viša u decidua nego u placenta u oba korištena modela, kao i da je razina IL-18 produkcije bila signifikantno viša u decidua i placenta CBA/J ženki križanih s BALB/c mužjacima, nego s DBA/2 mužjacima. Molekularnim metodama utvrdili smo statistički značajno veću ekspresiju glasničke RNA za IL-18 u deciduama nego u placentama u svim korištenim modelima. Osim toga razina ekspresije glasničke RNA za IL-18 bila je gotovo dvostruko viša u deciduama i signifikantno viša u placentama CBA/J ženki parenih s BALB/c mužjacima nego s DBA/2 mužjacima, tijekom implantacijskog razdoblja trudnoće. Molekularnim metodama smo utvrdili i slabu ekspresiju glasničke RNA za IL-16.

**ZAKLJUČAK:** Niska razina ekspresije IL-16 i IL-17 ukazuje da oni ne utječu bitnije na proces implantacije u miša. Dvije neovisne metode (ELISA i RT-PCR) kojima smo utvrdili ekspresiju IL-18 glasničke RNA i bjelančevine, pokazale su da je ekspresija bila statistički značajno veća u decidua i placenta CBA/J ženki parenih s BALB/c mužjacima. Time rezultati rada pridonose novim spoznajama o mogućnosti da IL-18 pokazuje učinak Th-1, kao i Th-2 citokina tijekom normalne trudnoće.

**KLJUČNE RIJEČI:** Decidua; IL-16; IL-17; IL-18; Feto-placentna jedinica ; Imunologija trudnoće; Imunotrofizam; Placenta; Th1/Th2 obrazac;

**TITLE :****POSSIBLE ROLE OF THE INTERLEUKINE-16, -17 AND -18 ON THE FETOPLACENTAL INTERFACE IN MICE****SUMMARY****OBJECTIVES**

Research of the possible regulation role of IL-16, IL-17 and IL-18 in pregnancy by establishing their expression at the mice fetoplacental interface during the implantation period in the syngenic and allogenic (normal and resorptive) cross-breeding combinations.

**MATERIALS AND METHODS**

Tissue samples of fetoplacental unit BALB/c and CBA/J female mice were used. The expression of IL-16, IL-17 and IL-18 was investigated by immunohistochemistry (IHC), while the values of IL-17 and IL-18 from supernatant of decidual and placental cultivated cells were quantified by the ELISA immunoensimatic method. Uterine NK cells were specifically labelled by dolichos biflorus lektin (DBA). The expression of IL-16 mRNA was determined semi-quantitatively by PCR reaction, while the expression of IL-18 mRNA was quantified by Real Time-PCR, using *LightCycler* System.

**RESULTS**

Using immunohistochemistry methods we found a weak expression of IL-16 and IL-17 and a strong expression of IL-18 proteins in basal proliferative uterine stroma during the implantation period of pregnancy. During 9,5-10,5 day of pregnancy, a brief but strong expression of IL-18 in the NK cells (uNK) on implantation site (decidua basalis) was observed. Wide distribution of IL-18 in decidua during the implantation period of pregnancy, as well as a short but strong expression in uNK, point at a possible regulation role of IL-18 in early pregnancy. The results obtained by ELISA showed that the production of IL-18 was higher in deciduas than in placentas in both models and that the production level of IL-18 was significantly higher in deciduas and placentas from CBA/J females mated with BALB/c males, than with DBA/2 males. Statistically significantly higher expression of IL-18 mRNA was determined in deciduas compared to placenta in all investigated models using molecular methods. The IL-18 expression level was almost twice higher in deciduas and significantly higher in placentas from CBA/J females mated with BALB/c males, than with DBA/2 males, during the implantation period of pregnancy. By using molecular methods, we also found a weak expression of IL-16 mRNA.

## **CONCLUSION**

No relevant effect of IL-16 and IL-17 during implantation in mouse was found according to low level of their expression. Two independent methods (ELISA and RT-PCR), by which we determined the IL-18 mRNA and protein expression, showed that the IL-18 expression was statistically significantly higher in deciduas and placentas from CBA/J females mated with BALB/c males. The results of our work contribute to new understanding of IL-18 role, both Th-1 as well as Th-2 cytokine during normal pregnancy in mice.

## **KEYWORDS**

CBA/JxDBA/2; Decidua; IL-16; IL-17; IL-18; Fetoplacental unit ; Immunology of pregnancy; Immunotrophisam; Placenta, Th1/Th2 paradigm;