

# Imunohistologija i funkcijska aktivnost limfocita humane decidue u prvom tromjesečju patoloških trudnoća

---

**Petrović, Oleg**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**1992**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:453987>

*Rights / Prava:* [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-12**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U RIJECI**

**Medicinski fakultet**

**OLEG PETROVIĆ**

**IMUNOHISTOLOGIJA I FUNKCIJSKA AKTIVNOST  
LIMFOCITA HUMANE DECIDUE U PRVOM  
TROMJESEČJU PATOLOŠKIH TRUDNOĆA**

**Doktorska disertacija**

**SVEUČILIŠNA KNJIŽNICA  
R I J E K A**



**930000244**

**Rijeka, 1992**

## I AUTOR

ime i prezime  
datum i mjesto rođenja  
zavod fakulteta i  
datum završetka studija  
daljnje zaposlenje

OLEG PETROVIĆ  
10. ožujka 1959. Knin  
Medicinski fakultet u Rijeci  
1982.  
Asistent Medicinskog fakulteta  
u Rijeci

## II DISERTACIJA

naslov

IMUNOHISTOLOGIJA I FUNKCIJSKA  
AKTIVNOST LIMFOCITA HUMANE DE-  
CIDUE U PRVOM TROMJESECJU PATO-  
LOŠKIH TRUDNOĆA

broj str., slika, ref.  
stanova i mjesto gdje  
je rad izrađen

112. str., 20. tab., 1. sl., 258. ref.  
Medicinski fakultet u Rijeci  
K.B.c. Rijeka

matematika  
mentor

Medicina  
doc. dr. Nikola Matejčić i prof.  
dr. Daniel Rukavina

fakultet na kojem je  
završena obrana

Medicinski fakultet u Rijeci

## III OCJENA I OBRANA

datum prijave teme

29. rujna 1990.

datum predaje rada  
datum sjednice Vijeća na  
kojoj je rad prihvaćen

27. travnja 1992.

16. srpnja 1992.

sastav Komisije koja  
 je rad ocijenila

prof. dr. Danilo Pavešić, prof. dr.  
Daniel Rukavina i prof. dr. Viš-  
nja Latin

24. srpnja 1992.

datum obrane rada

sastav Komisije pred  
 kojom je rad obranjen

I s t i

datum promocije

02. 07. 1993.

Dijagnostika patoloških trudnoća i sakupljanje materijala za citogenetska, morfološka i imunološka ispitivanja obavljena su na Klinici za ginekologiju i porodništvo Kliničkog bolničkog centra u Rijeci. Citogenetska analiza tkiva iz spontanih pobačaja izvršena je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. U Istituto per l' Infanzia, Trieste (Italia), provedena je imunohistološka obrada bioptičkog materijala, dok su protočna citometrija i sva funkcionalna imunološka ispitivanja rađeni na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Voditelji rada: prof. dr. Daniel Rukavina

doc. dr. Nikola Matejčić

Rad ima 105 stranica, 20 tablica i jednu sliku.

## PREDGOVOR

Osjećam osobitu potrebu zahvaliti se svom profesoru i mentoru, prof. dr. Danielu Rukavini, na nesebičnom zalaganju, stručnoj i ljudskoj pomoći koje mi je, ne štedeći svoje veliko znanje i dragocjeno vrijeme, iskazivao prilikom brojnih konzultacija.

Zahvaljujem se doc. dr. Nikoli Matejčiću na stručnoj pomoći, razumijevanju i spremnosti da me primi i sasluša onda kad mi je bilo najpotrebnije.

Riječi zahvale upućujem prof. dr. Aleksandri Frković koja mi je omogućila doći do tako bogatog kliničkog materijala koji obrađujem u svom radu.

Sretan sam što imam suradnike dr. Gordanu Rubešu, mr. sc. Leu Gudelj i dr. sc. Hermana Hallera na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci, koji su svojim nesebičnim radom, stručnošću i zalaganjem, uz ostale djelatnike spomenutog Zavoda, omogućili da ovaj rad ugleda svjetlost dana.

Mr. sc. Bojani Milić-Brajenović i njenim suradnicima na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci zahvaljujem se na velikoj pomoći i trudu prilikom citogenetske obrade tkiva.

Osobitu zahvalnost dugujem osoblju Odjela za planiranje obitelji na čelu s prof. dr. Ljiljanom Handić i osoblju Odsjeka za patologiju trudnoće Klinike za ginekologiju i porodništvo KBC u Rijeci, što su mi svojim razumijevanjem, strpljivošću i osobnom angažiranošću omogućili sakupiti potreban klinički materijal i tako pomoći u ostvarenju mog konačnog cilja.

Zahvaljujem se svom bratu, dipl. ing. Igoru Petroviću, na svesrdnoj pomoći prilikom tehničkog dijela izrade ovog rada.

## SAŽETAK

Imunološka zbivanja na razini horiodecidualnog spoja u središtu su zanimanja znanstvenika koji žele proniknuti u tajnu opstanka humanog embrija u za njega stranom okruženju majčinog organizma. Bitne lokalne promjene pod utjecajem trofoblasta odvijaju se u decidui koja predstavlja decidualizirani endometrij. Proces stanične proliferacije i diferencijacije i lokalno lučenje za trudnoću specifičnih solubilnih molekula stvaraju osobit decidualni stanični milje posebnih funkcionalnih sposobnosti.

Cilj istraživanja bio je, nakon citogenetske obrade spontanih pobačaja, definirati leukocitne subpopulacije u decidui normalnih i patoloških trudnoća prvog tromjesečja i ispitati njihove funkcije. Citogenetskom analizom stanica trofoblasta i embrija u slučajevima spontanih pobačaja prvog tromjesečja nađen je visok postotak kromosomskih aberacija. U skupini trudnoća blighted ovum postotak kromosomopatija iznosio je 60%, a u skupini trudnoća missed abortion 16%. Fenotipska karakterizacija dviju temeljnih skupina stanica, decidualnih limfocita i decidualnih makrofaga, izvršena je pomoću imunohistološke pretrage na decidualnom materijalu dobivenom ciljanom biopsijom i analizom sadržaja decidualnih limfocitnih suspenzija u protočnom citometru. Pomoću specifičnih monoklonskih antitijela, tehnikom indirektno imunoperoksidaze, pokazano je da u bazalnoj i parijetalnoj decidui nema bitnijih razlika u sastavu i rasporedu ispitivanih leukocitnih subpopulacija. U decidui normalnih i ispitivanih patoloških trudnoća najbrojniji su bili decidualni makrofagi, a potom slijede NKH-1+ i CD2+ stanice. Ukupan broj CD4+ i CD8+ stanica bio je višestruko veći od broja inače brojčano oskudnih CD3+ stanica, što potvrđuje činjenicu da i druge decidualne stanice osim zrelih T limfocita mogu eksprimirati spomenute antigene. Nakon enzimatske obrade decidualnog tkiva, iz suspenzije decidualnih leukocita razdvojene su adherencijom za plastičnu podlogu adherentna (decidualni makrofagi) od neadherentne frakcije stanica

(decidualni limfociti). Ovako pripravljene suspenzije limfocita iz decidua normalnih i patoloških trudnoća prvog tromjesečja analizirane su metodom protočne citometrije, a korištene su i za funkcionalna ispitivanja pomoću testa blastične transformacije i reakcije pomiješanih limfocita. U odnosu na limfocite periferne krvi trudnica među kojima, ne računajući CD2+ stanice, prevladavaju CD3+ i CD4+ stanice, u suspenzijama decidualnih limfocita u svim skupinama ispitivanih ranih trudnoća najbrojnije su (poslije CD2+ stanica) bile CD11-c+ i CD8+ stanice. Potpuna inverzija omjera CD4+/CD8+ i CD4+/CD11-c+ stanica u decidui intrauterinih ranih trudnoća u odnosu na omjere spomenutih stanica u perifernoj krvi trudnica rezultat je, s jedne strane smanjenja broja CD3+ CD4+ stanica, a s druge strane povećanja udjela CD11-c+ stanica, vjerojatno pod neposrednim utjecajem trofoblasta. Udio decidualnih granuliranih limfocita koji osim NKH-1 antigena mogu, izgleda, ekspimirati i CD11-c antigen, bio je podjednako velik u normalnim (44%) i patološkim intrauterinim trudnoćama missed abortion (44%) i blighted ovum (48%). Budući da je postotak decidualnih granuliranih limfocita u decidui izvanmaterničnih trudnoća (24%) znatno manji u odnosu na deciduu materničnih ranih trudnoća, ali veći od postotka granuliranih limfocita u perifernoj krvi trudnica, izgleda da trofoblast i dijelom lokalni humoralni faktori potiču migraciju/proliferaciju spomenutih stanica u decidualnom tkivu.

Bez obzira na vrstu ispitivane rane humane trudnoće, decidualni limfociti i decidualni makrofagi u kulturi bili su spontano jače proliferirali od singeničkih limfocita periferne krvi. Relativno mali udio zrelih T limfocita među ostalim oblicima decidualnih T stanica i "poplava" vrlo potentnih solubilnih tvari koje luče aktivirane T stanice i decidualni makrofagi, vjerojatno su uzrok in vitro intenzivne spontane proliferacije, u prvom redu, decidualnih limfocita. Nasuprot tome, jedino su limfociti periferne krvi trudnica pokazali snažan proliferacijski odgovor nakon stimulacije kultura s poliklonskim mitogenima (osobito s PHA) i aloantigenima. Podjednako snažan immunosupresijski učinak na proliferaciju singeničkih limfocita periferne krvi u kulturi stimuliranoj s PHA

od strane decidualnih limfocita i makrofaga u normalnim i anembrionskim trudnoćama prvog tromjesečja dokaz je da imunosupresijska aktivnost decidualnih leukocita nije ovisna o prisustvu embrija, već da je dostatan vijabilni i stimulacijski sposoban trofoblast. S druge pak strane, odsustvo supresijske aktivnosti decidualnih limfocita u skupini trudnoća missed abortion, izvanmaterničnih trudnoća i ponavljanih spontanih pobačaja posredno ukazuje na važnu ulogu intaktnog trofoblasta u indukciji/stimulaciji lokalne imunosupresije. Nasuprot decidualnim limfocitima, izgleda da se supresijska aktivnost decidualnih makrofaga u humanoj ranoj decidui može potaći i bez neposrednog dodira s trofoblastom.

Autor na kraju zaključuje da je za regulaciju imunog odgovora majčinog organizma prema embriotrofoblastnom alotransplantatu presudan utjecaj indukcijski/stimulacijski sposobnog trofoblasta i specifičnih humoralnih faktora, kako zbog utjecaja na stvaranje specifičnog staničnog decidualnog miljea, tako i zbog indukcije specifičnih funkcijskih sposobnosti decidualnih imunokompetentnih stanica. Ispitivanja leukocitnih subpopulacija i njihovih funkcija u humanoj decidui patoloških trudnoća prvog tromjesečja nude bitno nov pristup u istraživanju imunoregulacijskih mehanizama na razini horiodecidualnog spoja.



## SUMMARY

Immunologic events at the choriodecidual level are in the centre of interest of the scientists who would like to discover the secret of human embryo survival in a strange maternal surrounding. The important local changes under the trophoblastic influence could be found in decidual tissue which represents a decidualized endometrium. Process of cellular proliferation and differentiation and local secretion of pregnancy specific soluble molecules create a particular decidual cellular milieu of special functional abilities.

The aim of this investigation was to define leucocytic subpopulations and their functions in decidual tissues of normal and pathologic first trimester human pregnancies. A high percentage of chromosomopathies was found in cases of first trimester spontaneous abortions by cytogenetic analysis of trophoblastic and/or embryonic cells. There was 60% of chromosomopathies in the group of blighted ova, while 16% of chromosomal anomalies was in the group of early missed abortions.

Phenotypic characterization of the two major groups of cells, decidual lymphocytes and decidual adherent cells (macrophages), was performed by immunohistologic studies on byoptic material and flow cytometry analysis of decidual lymphocyte suspensions. By the use of specific monoclonal antibodies and an indirect immunoperoxidase technique, it was shown that there were no significant differences in a composition and distribution of examined leucocytic subpopulations between basal and parietal decidua. In decidual tissues of normal and the studied kinds of abnormal pregnancies, the most prominent cells were decidual macrophages followed by NKH-1+ and CD2+ decidual cells. A total number of CD4+ and CD8+ cells was manifold higher than a number of poorly present CD3+ cells. This confirmed the fact that even other decidual cells, apart from mature T lymphocytes, could express the mentioned surface antigens. After an enzymatic dezaggregation (0.125% Trypsine) of decidual tissue, adherent cell fraction

(decidual macrophages) was separated from nonadherent cells (decidual lymphocytes) in decidual leucocyte suspensions by a process of adherence to the plastic basis. Lymphocyte suspensions from decidual tissue of normal and abnormal first trimester pregnancies, prepared in this way, were analysed by flow cytometry. The mentioned cell suspensions were also used for functional studies in proliferation tests and mixed lymphocyte reactions. Compared with peripheral blood lymphocytes of pregnant women, among which, apart from CD2+ cells, CD3+ and CD4+ cells were dominant, in decidual lymphocyte suspensions of all groups of the examined early pregnancies CD2+ cells were followed by CD11-c+ and CD8+ decidual cells. The complete inversion of indexes CD4+/CD8+ and CD4+/CD11-c+ cells in decidual tissues of intrauterine early pregnancies in relation to the indexes of the CD4, CD8 and CD11-c peripheral blood positive cells is the result of, on the one hand, a reduction of CD3+ CD4+ cells number, and on the other hand, the consequence of an increase of the portion of CD11-c+ cells influenced by trophoblastic tissue. The representation of decidual granulated lymphocytes, that apart from NKH-1 surface antigen could express even CD11-c differentiation antigen, was similar in the groups of normal (44%) and abnormal first trimester pregnancies (40% - 48%). Since the representation of decidual granulated lymphocytes in decidual tissue of ectopic pregnancies (24%) was significantly lower in relation to decidua of intrauterine early pregnancies, but higher than the proportion of granulated lymphocytes in peripheral blood of pregnant women, it seems that trophoblast and local humoral factors could induce a migration/proliferation of the mentioned cells in decidual tissue.

Without regard to the kind of early human pregnancies examined, decidual lymphocytes and decidual adherent cells proliferated spontaneously stronger than peripheral blood lymphocytes of the same pregnant woman. A relatively small proportion of mature T lymphocytes among other forms of decidual cells and numerous potent soluble substances which are secreted by activated T cells and decidual macrophages, are the possible causes of intensive spontaneous cell proliferation, particularly of decidual lymphocytes.

On the contrary, the peripheral blood lymphocytes were the only which have shown particularly strong proliferation in response to polyclonal mitogens (especially PHA) and alloantigens. Compared with a poor decidual leucocyte proliferation after mitogen stimulation, an intensive proliferation of peripheral blood lymphocytes in response to polyclonal mitogens is, probably, a result of a manifold higher proportion of mature T lymphocytes (CD3+) in peripheral blood in relation to the presence of CD3+ cells in decidual tissues of early human pregnancies.

A similarly strong immunosuppressive effect of decidual lymphocytes and decidual adherent cells on the cultured peripheral blood lymphocyte proliferation stimulated by PHA in normal and anembryonic first trimester pregnancies is the confirmation that immunosuppressive activity of decidual leucocytes does not depend on embryo presence. It seems, that a viable and stimulating trophoblast is quite sufficient to provoke local immunosuppression. In addition, a lack of suppressor activity of decidual lymphocytes in the groups of early missed abortions, ectopic pregnancies and recurrent spontaneous abortions indirectly showed an important role of an intact trophoblast in induction/stimulation of local immunosuppression. Compared with decidual lymphocyte suppressor activity, it appears that suppressor activity of decidual adherent cells (macrophages) could be induced by humoral factors without any intimate contact with trophoblastic tissue.

Author concludes that an influence of the intact trophoblastic tissue on regulation of maternal immune response to the embryoplacental allotransplant is crucial, because of its ability to create a specific decidual cellular milieu, as well as particular cellular functions. Characterization of leucocytic subpopulations and their functions in decidual tissue of abnormal first trimester human pregnancies offer a significantly new approach to the investigations of immunoregulatory mechanisms at choriodecidual junction.

# SADRŽAJ

## PREDGOVOR

## SAŽETAK

## SUMMARY

Stranica

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Imunološka tolerancija embrija/fetusa .....	1
1.2. Trofoblast .....	2
1.3. Sustavni imunološki odgovor u trudnoći .....	4
1.4. Lokalna razina imunoregulacijskih mehanizama u trudnoći .....	8
1.4.1. Razvoj decidue .....	8
1.4.2. Populacije stanica u humanoj decidui .....	9
1.4.2.1. Decidualni makrofagi .....	9
1.4.2.2. Decidualni limfociti .....	10
1.4.3. Supresijska aktivnost stanica decidue .....	12
1.5. Patološke trudnoće prvog tromjesečja .....	14
1.5.1. Uzroci spontanih pobačaja u humanoj reprodukciji .....	15
1.5.2. Imunološki mehanizmi kao potencijalni uzroci pobačaja .....	16
1.6. Cilj istraživanja .....	21
<b>2. MATERIJAL I METODE</b> .....	24
2.1. Vrste ispitivanih patoloških trudnoća .....	24
2.2. Citogenetska analiza tkiva pobačenih produkata oplodnje .....	26
2.3. Biopsija i kiretaža decidualnog tkiva .....	27
2.4. Imunohistologija .....	38
2.5. Dobivanje suspenzije leukocita iz decidualnog tkiva .....	29
2.6. Kultivacija decidualnih leukocita .....	30
2.7. Razdvajanje frakcija decidualnih leukocita .....	30
2.8. Identifikacija leukocitnih subpopulacija u suspenziji	
leukocita decidue i periferne krvi trudnica .....	30
2.9. Dobivanje limfocita iz periferne krvi trudnica .....	32

2.10. Test blastične transformacije .....	32
2.11. Reakcija pomiješanih limfocita .....	33
2.12. Statistička obrada podataka .....	34
<b>3. REZULTATI .....</b>	<b>35</b>
3.1. Citogenetska analiza .....	35
3.2. Imunohistologija .....	35
3.3. Identifikacija leukocitnih subpopulacija u suspenziji	
leukocita decidue i periferne krvi trudnica .....	37
3.3.1. Periferna krv trudnica .....	38
3.3.2. Suspenzije decidualnih limfocita .....	39
3.3.2.1. Skupina normalnih trudnoća .....	39
3.3.2.2. Skupine patoloških trudnoća .....	40
3.4. Stimulacija poliklonskim mitogenima .....	41
3.4.1. Skupina normalnih trudnoća .....	42
3.4.2. Skupine patoloških trudnoća .....	42
3.5. Imunosupresijski učinak decidualnih leukocita .....	43
3.5.1. Skupina normalnih trudnoća .....	44
3.5.2. Skupine patoloških trudnoća .....	44
<b>4. RASPRAVA .....</b>	<b>48</b>
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>78</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>82</b>

## 1. UVOD

Jedna od dosad neobjašnjenih zagónetki u biologiji je prirodni mehanizam pomoću kojeg embrio/fetus preživljava imunološku reakciju majčinog organizma a da ne bude odbačen. Uspješan tijek i završetak trudnoće uvijek iznova zadivljuju budući da prkose temeljnim postavkama transplantacijske imunologije (7, 44, 129, 174).

Embrio predstavlja za majčin organizam strano tkivo u opsegu koji je određen očevim genetskim faktorima. Kao jedinku iste biološke vrste fetus se može shvatiti alogeničkim transplantatom pri čemu maternica predstavlja ležište prirodno izvršene transplantacije. To je, međutim, samo djelomično točno, jer je postojanjem posteljice koja je dijelom fetalnog porijekla fetus posredno implantiran u organizam majke. Posteljica je pravo mjesto neposrednog dodira fetalnog i majčinog tkiva i mjesto gdje trofoblast neposredno uranja u majčinu krv. Trofoblast, prema tome, predstavlja anatomsku i imunološku "barijeru" koja ograničava fetomaternalnu razmjenu staničnih elemenata i različitih makromolekularnih tvari. Posteljica, dakle, ima ulogu u razdvajanju dva imunološka sustava, majčinog imunokompetentnog i fetalnog koji tek stiže imunokompetenciju.

### 1.1. IMUNOLOŠKA TOLERANCIJA EMBRIJA/FETUSA

Središnji problem imunoloških odnosa između majke i ploda je **imunološka tolerancija ploda**. Za objašnjenje ovog fenomena potrebno je razmotriti sustavne imunološke promjene u trudnoći te lokalne uvjete implantacijskog mjesta, prije svega posebnosti trofoblastnog i decidualnog tkiva.

Više je hipotetskih mehanizama kojima se pokušao objasniti spomenuti fenomen imunološke tolerancije fetusa. Tako su jedni autori bili pristalice teorije o maternici kao imunološki povlaštenom mjestu (158, 159), dok su

drugi posteljicu promatrali kao vrlo djelotvornu imunološku barijeru (35, 77, 233, 258). Neki su, pak, autori preživljavanje fetalnog transplantata smatrali posljedicom općeg slabljenja imunobiološkog sustava majke koje je uzrokovano isključivo trudnoćom (8, 139, 159). Bilo je također mišljenja da nezrelo fetalno tkivo nije dovoljno imunogeno i da kao takvo ne može ni izazvati majčin imuni odgovor (159). Morfološke i funkcionalne promjene imunološkog sustava žene u trudnoći, koje su dobrim dijelom poznate, demantiraju, međutim, većinu ovih navoda. U trudnoći se tako može opaziti povećanje regionalnih periuterinih i paraaortalnih limfnih čvorova. Ovo povećanje posljedica je hiperplazije stanica, što je posredni dokaz odvijanja aktualne imunološke reakcije u spomenutim limfnim čvorovima. Opisana imunološka reakcija u regionalnim limfnim čvorovima i činjenica da se intrauterini kalemi kože promptno odbacuju u preosjetljivom domaćinu očiti su dokazi da maternica nije imunološki povlašteno mjesto (10, 216). Teorija o neimunogenosti nezrelog fetalnog tkiva nije se također održala. Webb i sur. (245) i Searle i sur. (212) pokazali su, naime, da se paternalni antigeni mogu prepoznati na produktu oplodnje već 96 sati nakon stvaranja zigote (preimplantacijska faza). Ahrons i sur.(1) dokazali su da žene ne stvaraju antipaternalna anti- HLA antitijela prije svoje prve trudnoće. I drugi autori iznose dokaze da jedino koncepcija i trudnoća provociraju specifični majčin imunološki odgovor na paternalne HLA antigene (5, 226). Ovo su ujedno dokazi o nesavršenosti fetusa kao transplantata, budući da u svog domaćina izaziva i humoralni i celularni imuni odgovor.

## 1.2. TROFOBLAST

Trofoblast se, invadirajući sluznicu maternice (63, 185, 186), diferencira u dva sloja (27, 35, 120, 148): **sinciotrofoblast** - vanjski, površinski sloj stanica koji gubi stanične membrane i pretvara se u jedinstvenu masu citoplazme s mnogobrojnim jezgrama, i **citotrofoblast** - unutarnji sloj koji čini jedan red velikih stanica s jezgrom i koje su međusobno odvojene staničnim

membranama. Izgleda da postoji i osobita vrsta trofoblastnih stanica sa specifičnim morfološkim, biokemijskim i funkcionalnim karakteristikama, koja možda predstavlja intermedijarni stadij u diferencijaciji primordijalnog trofoblasta (132). Sinciciotrofoblast, prema tome, u neposrednom je kontaktu s majčinom krvi, odnosno njezinim imunokompetentnim stanicama. Budući da nosi polovicu antigena očevog porijekla, sinciciotrofoblast bi, prema temeljnim postavkama transplantacijske imunologije, trebao izazvati reakciju odbacivanja od strane imunološkog sustava majke. To se ipak ne događa. Trofoblastni sloj na površini posteljice ponaša se, dakle, kao vrlo djelotvorna imunološka barijera. Ne samo što predstavlja gotovo savršenu fizičku barijeru čiji glikokaliks svojim negativnim električnim potencijalima odbija električki negativne majčine limfocite, nego on može biti i neposredno odgovoran za posve neprikladnu ili pak izostalu majčinu imunološku reakciju prema nepoznatim antigenima fetoplacentne jedinice. Izgleda, naime, da sinciciotrofoblast gubi svoje površinske antigene još u fazi priprema za invaziju sluznice maternice. Tako, autori koji su pomoću monoklonskih antitijela istraživali ekspresiju HLA antigena trofoblasta, nisu uspjeli na površini sinciciotrofoblasta dokazati postojanje ni HLA antigena klase I niti HLA antigena klase II (79, 108, 116, 155, 157, 170, 208). Kako su HLA antigeni klase I odgovorni za imunološku reakciju odbacivanja, to se može pretpostaviti da je "odsustvo" spomenutih klasičnih HLA antigena jedan od bitnih imunoloških mehanizama zaštite fetusa od staničnog imunološkog sustava majke. Činjenica, međutim, da su u primigravida koje nikad nisu primile transfuziju krvi, dokazana specifična antipaternalna anti-HLA antitijela (5, 142, 226) najprije pretpostavlja prisustvo stranih očevih HLA antigena na horionskim resicama, zatim njihovo prepoznavanje te stvaranje specifičnih anti-HLA antitijela od strane majčinog imunosustava. Daljnjim istraživanjima nađeni su HLA antigeni klase I u stromi horionskih resica i ekstraviloznom trofoblastu (27, 79, 155, 191). Identičnu raspodjelu eksprimiranih monomorfni HLA antigena klase I našli su Bulmer i sur. (30) i u molarnim trudnoćama. Još uvijek nije jasno da li su HLA antigeni prisutni na površini



sinciciotrofoblasta (257). Postoji, naime, mogućnost da je njihova količina ili gustoća toliko malena da ih se nedovoljno osjetljivim metodama ne može otkriti (241), ali isto tako i da je njihovo postojanje jednostavno dobro prikriveno drugim makromolekulama (27, 69). Neki autori su mišljenja da je ekspresiju HLA antigena sinciciotrofoblasta moguće modulirati, čime bi se promijenilo njihove identifikacijske karakteristike (27, 241, 257). To bi, dakako, otežalo ili potpuno onemogućilo identifikaciju HLA antigena na trofoblastu iako su oni fizički prisutni. Vjerojatnom se drži i teorija o kontaktu majčinih imunokompetentnih stanica, stanica ekstraviloznog citotrofoblasta i stanica strome horionskih resica koje nose fetalne/paternalne HLA antigene klase I. Spomenuta teorija pretpostavlja postojanje "rupa" kroz inače HLA antigenski nijemi sinciciotrofoblast, kroz koje je moguće da se odvijaju procesi imunološkog prepoznavanja i reakcije između fetalnog i majčinog tkiva. Veliki broj stanica trofoblasta svakodnevno se otplavljuje za vrijeme normalne trudnoće u majčin krvotok pa bi i to mogao biti jedan od mogućih načina prezentacije fetalnih antigena majčinom imunom sustavu (107, 229). Bez obzira na mehanizam prepoznavanja stranih fetalnih antigena od strane majčinog organizma, činjenica je da se ono stvarno događa, pri čemu je odgovor potpuno u neskladu s osnovnim načelima transplantacijske imunologije (206). Facilitacijski mehanizmi majčinog organizma očigledno nadvladavaju imunološke mehanizme odbacivanja stranog fetalnog tkiva. Pritom nije vjerojatno da postoji samo jedan mehanizam odgovoran za uspješno preživljavanje fetusa, već je logično očekivati da je u održavanju trudnoće uključeno više zaštitnih mehanizama.

### **1.3. SUSTAVNI IMUNOLOŠKI ODGOVOR U TRUDNOĆI**

Organizam žene mijenja se u trudnoći, a promjene zahvaćaju sve organske sustave pa tako i imunobiološki. Embrio/fetus, odnosno embrioplacentna jedinica u cjelini, strani su majčinom imunološkom sustavu u opsegu koji je određen udjelom majci nepoznatih očevih antigena u njenoj

antigenskoj strukturi. Spomenuti transplantacijski antigeni koje je embrio naslijedio od oca izazivaju u svom domaćinu humoralnu i staničnu imunološku reakciju koje u normalnim uvjetima, protivno temeljnim zakonima transplantacijske imunologije, ne dovode do odbacivanja embrionalnog alotransplantata. To podrazumjeva postojanje imunoregulacijskih humoralnih i staničnih faktora koji moduliraju specifični imunološki odgovor majke na način da se plodu omogući preživljavanje i normalan rast. Tako je u serumu trudnica dokazano prisustvo mnogih tvari. Neke od njih pojavljuju se isključivo u trudnoći, dok su druge prisutne i izvan trudnoće, ali im se rastom i razvojem oplodene jajne stanice koncentracije mnogostruko povećavaju (20, 111, 131). Zanimanje za spomenute tvari naglo je poraslo kad se pretpostavilo da bi one mogle imati ulogu u modulaciji majčinog imunog odgovora prema fetoplacentnoj jedinici. Sinteza solubilnih molekula odvija se u stanicama trofoblasta i decidualnom tkivu pa je razumljivo da im je lokalna koncentracija mnogo veća od serumske. Već u preimplantacijskoj fazi izlučuje se tzv. faktor rane trudnoće (engl. early pregnancy factor - EPF) sa snažnim imunosupresijskim djelovanjem (161, 173, 213, 227). Sintezu estrogena i naročito progesterona već u prvom tromjesečju preuzima tkivo trofoblasta (149), a njihova se koncentracija povećava razmjerno dobi trudnoće. Za progesteron je dokazano imunosupresijsko djelovanje koje se ostvaruje posredstvom hormonski ovisnih decidualnih stanica koje luče supresijske solubilne molekule (17, 101, 215)

Sinciciotrofoblast izlučuje i niz drugih tvari (258), a među najpoznatijima su humani horionski gonadotropin (hCG) (72, 209), humani placentni laktogen (= horionski somatomotropin) (209, 238), za trudnoću specifični beta<sub>1</sub> -glikoprotein (engl. pregnancy specific beta<sub>1</sub> -glycoprotein) (176), placentni izoferitin, alfa<sub>2</sub> -globulin i drugi. Pored toga, i fetalna tkiva sintetiziraju i otpuštaju u krvotok tvari kojima se, između ostalog, pripisuje imunomodulacijsko djelovanje. Izgleda da alfa-fetoprotein može tako neposredno stimulirati nastanak T supresijskih stanica (171).

Nabrojene tvari nisu u stanju same, a niti u kombinaciji, spriječiti imunološko odbacivanje embrioplacentne jedinice od strane majčinog organizma, ali mogu svojim ukupnim i nedovoljno upoznatim nespecifičnim učinkom reducirati specifičnu reaktivnost imunokompetentnih stanica majke i tako doprinijeti zaštiti fetusa od transplantacijske reakcije.

Dokaz imunosupresijske aktivnosti spomenutih ali i drugih još nepoznatih tvari na imuni sustav majčinog organizma očituje se u trudnoći i poboljšanjem kliničkog tijeka autoimunih bolesti poput reumatoidnog artritisa (182), te kliničkog pogoršanja u trudnica koje boluju od malarije (242) i drugih infekcijskih bolesti (96, 247, 255).

Pokusi na životinjskom modelu, *in vitro* i *in vivo*, pokazali su da više različitih solubilnih faktora izoliranih iz trofoblastnog tkiva modulira imunološke reakcije majčinog organizma prema stranim fetalnim antigenima glavnog sustava gena tkivne snošljivosti. Svojim imunosupresijskim djelovanjem spomenuti faktori reverzibilno blokiraju efektorske stanice u procesima lize - prirodne stanice ubojice (NK stanice), LAK stanice (engl. lymphokine activated killer cells), stanice ubojice (K stanice) odgovorne za staničnu citotoksičnost ovisnu o antitijelima (engl. antibody dependent cellular cytotoxicity) i citotoksične T limfocite (engl. cytotoxic T lymphocytes) (39, 40). Prema Chaouat i sur. (42) opisane biološke reakcije spadaju među najvažnije imunološke mehanizme kojima trofoblast zaštićuje fetus od odbacivanja.

U trudnoći majčini limfociti prepoznaju i reagiraju na antigenske i druge proteinske molekule fetoplacentne jedinice. Općenito bi se moglo reći da pojava raznih antitijela u serumu trudnice nema odlučujući utjecaj na uspješnost ili neuspješnost aktualne trudnoće, što dokazuju normalan tijek i svršetak trudnoća u žena u kojih se prisustvo takvih antitijela nije moglo dokazati (5, 62, 115, 201). Žene oboljele od agamaglobulinemije mogu, na primjer, uspješno iznesti trudnoću (202). Pokusi na mišjem modelu *s in vivo*

učinjenom deplecijom B limfocita potvrdili su da se alogenička trudnoća i u takvim uvjetima može uspješno razvijati.

Jedan dio aloantitijela u nekih trudnica pokazuje i limfocitotoksičnost a ova je usmjerena specifično na HLA antigene očevog porijekla (233). Istraživanja Gilla (85) i Stewarta i sur. (225) pokazala su da posteljica ima sposobnost adsorpcije spomenutih citotoksičnih antitijela. Oni su ih, naime, našli adsorbirane na posteljici i u slučajevima kad se citotoksična antitijela u serumu istih trudnica nisu mogla dokazati. Antipaternalna citotoksična anti HLA antitijela (85) i druga antitijela specifično usmjerena na površinske aloantigene fetoplacentne jedinice (18, 55, 77, 105, 154, 170), koja se mogu naći u serumu trudnica, nepobitno dokazuju da se u trudnoći odvija proces imunizacije majčinog organizma na nepoznate aloantigene fetoplacentne jedinice. Jednom takvom novom aloantigenskom sustavu otkrivenom na površini trofoblasta pomoću monoklonskih antitijela, pripisuje se važna uloga u regulaciji složenih fetomaternalnih imunoloških odnosa (13, 23, 27, 154, 157). Radi se o tzv. TLX antigenima za koje je pokazano da su zajednički za sve stanice trofoblasta, neke epitelne stanice i limfocite u perifernom majčinom krvotoku (13, 155, 157). Budući da je TLX antigenski sustav polimorfičan, očekuje se da će strani očevi TLX antigeni na površini sinciciotrofoblasta izazvati majčin imunološki odgovor. Štoviše, Faulk i sur. (76, 155) zastupaju mišljenje da je za normalnu trudnoću upravo potrebno da se TLX antigeni majke i oca međusobno razlikuju i da je neophodno majčino stvaranje specifičnih anti-TLX antitijela koja kao blokirajuća antitijela štite fetalni alotransplantat od imunološke reakcije odbacivanja i tako se dovode u vezu s uspješnim tijekom trudnoće. Majčin odgovor na očeve TLX antigene mogao bi biti i u formi aktivne regrutacije supresijskih limfocita u lokalne limfne čvorove, čime se oni povećavaju, te u decidualno tkivo (13). Spomenuta blokirajuća antitijela karakterizira nesposobnost vezivanja komplementa i nemogućnost izazivanja procesa lize trofoblastnog tkiva (76, 155). Istina, mnogi znanstvenici ukazuju i na prirodnu otpornost trofoblasta na razne oblike lize posredovane stanicama (alogenička citotoksičnost

izazvana T limfocitima, stanična citotoksičnost ovisna o antitijelima, liza posredovana prirodnim stanicama ubicama). U pokusima u kojima je ispitivana osjetljivost stanica humanog trofoblasta iz trudnoća prvog tromjesečja i NK (engl.natural killer cells = prirodne stanice ubice) osjetljive stanične linije K562 (kontrola) na lizu posredovanu NK stanicama iz periferne krvi kao i na lizu posredovanu decidualnim limfocitima, potvrđena je otpornost stanica trofoblasta (124). Neki autori pokušavaju spomenute rezultate objasniti odsustvom ciljnih struktura na trofoblastu, koje decidualne NK stanice (Leu 19+/CD56+) inače prepoznaju (125).

Humani trofoblast ima k tome i svojstvo biosinteze više različitih faktora sa supresivnim učinkom na limfocite u in vitro uvjetima, kojima može spriječiti lizu stanične linije K562 (62, 205). Jedan od mehanizama supresije citotoksičnosti izgleda da se može ostvariti posredstvom modulacije aktivnosti interleukin-2 (IL- 2) (14, 62, 67) čije je prisustvo u trofoblastu dokazano imunohistokemijskim metodama, a u serumu trudnica enzimatском pretragom (78). Receptori za IL-2 nisu, međutim, pronađeni na stanicama cito- ni sinciciotrofoblasta (29) pa je uloga IL-2 u imunologiji humane reprodukcije zasad nepoznata (192).

## **1.4. LOKALNA RAZINA IMUNOREGULACIJSKIH MEHANIZAMA U TRUDNOĆI**

### **1.4.1. Razvoj decidue**

U drugoj fazi menstruacijskog ciklusa, pod utjecajem progesterona iz žutog tijela jajnika, sluznica maternice se mijenja. Stanice strome endometrija se povećavaju, postaju poligonalne, vakuole u citoplazmi sve su bogatije glikogenom, a sluznica u cjelini postaje debljom (199, 235). Spiralne arteriole se izdužuju i šire (63, 133, 249). Oplodnjom jajne stanice povećava se lučenje progesterona iz žutog tijela trudnoće a proces upravo opisane **decidualizacije** priprema sluznicu maternice za prihvāt i implantaciju

blastociste. Sluznica maternice ili kako se sada naziva **decidua** (235) sadrži pored stromalnih stanica i veći broj leukocita - decidualnih makrofaga i limfocita (28, 186). Plazma stanice se u normalnim uvjetima obično ne nalaze (24, 122).

#### **1.4.2. Populacije stanica u humanoj decidui**

U humanoj decidualnom tkivu trudnoće prvog tromjesečja razlikuju se u osnovi dvije skupine stanica: **decidualizirane vezivne stanice strome i stromalni granulociti** (94, 248). Decidua u prvom tromjesečju trudnoće, kao i sekrecijski endometrij, bogato su zastupljeni spomenutim granulocitnim stanicama, dok se napredovanjem trudnoće njihov broj progresivno smanjuje (248). Granula u citoplazmi ovih stanica pokazuju poseban afinitet prema boji phloxine tartrazine (28, 186) pa se spomenuto bojenje specifično koristi za histološku identifikaciju endometrijskih/decidualnih granulocita. U literaturi se opisuje veća gustoća ovih granulocita oko spiralnih arteriola i njenih ogranaka te u neposrednoj blizini endometrijskih žlijezda. Imunohistološke metode pretrage daljnji su napredak u identifikaciji i karakterizaciji decidualnih stanica. One su omogućile jasno razlikovanje stromalnih stanica decidue od decidualnih leukocita te podjelu leukocita na stanične subpopulacije. Decidualni leukociti koji su pozitivni za stanični marker CD45 predstavljaju tako dvije velike i u osnovi različite skupine stanica: makrofage i limfocite.

##### **1.4.2.1. Decidualni makrofagi**

Uz male varijacije u broju, ovisne o fazi menstruacijskog ciklusa, te kroz svo vrijeme trajanja trudnoće, makrofagi su bogato zastupljeni u staničnom miljeu endometrija odnosno decidue (34). Većina makrofaga nosi na površini stanične membrane humane leukocitne antigene (HLA)-DR, DP, i DQ (33, 142). U decidui prvog tromjesečja trudnoće prevladavaju HLA-DR pozitivne

stanice (33). Pritom su osobito zastupljeni CD14+ makrofagi koji se uglavnom nalaze uz ekstravilozni trofoblast (26, 35, 117).

Decidualni makrofagi koji nose antigene klase II, izgleda, mogu prezentirati strane antigene T limfocitima (imunofacilitacija) (177, 213), a uz to su i bolji induktori supresijskih stanica od HLA-DR+ stanica periferne krvi (178). Njihova aktivnost dijelom je posredovana sintezom prostaglandina PGE<sub>2</sub> koji inhibira produkciju IL-2 i ekspresiju receptora za IL-2, koji su neophodni za transplantacijsku reakciju (7, 44, 126). Dopunsku ulogu u prezentaciji stranih antigena čini se da imaju rijetki CD1+ decidualni makrofagi prisutni uglavnom uz endotelne stanice žlijezda (28, 68). Nalaz nespecifičnih esteraza i kisele fosfataze u makrofagima humane decidue, međutim, ukazuje na njihovu vjerojatno najvažniju zadaću za vrijeme trudnoće - fagocitozu (26, 117).

#### 1.4.2.2. Decidualni limfociti

Prisustvo limfocita u decidui opaža se kroz cijelo vrijeme trajanja trudnoće, ali ih brojčano ima najviše u prvom tromjesečju. Pritom su B limfociti zastupljeni u vrlo malom broju (35, 36). U istom vremenskom razdoblju trudnoće markere klasičnih T limfocita (CD2+, CD3+) ima samo 5% decidualnih leukocita (36, 117). Imunohistološke studije na sluznici maternice izvan trudnoće pokazuju da su supresijski/citotoksični T limfociti (fenotip CD3+, CD8+) zastupljeniji od pomagačkih T limfocita (fenotip CD3+, CD4+). Pritom treba napomenuti da CD4 antigen nose i makrofagi i neke druge endometrijske odnosno decidualne stanice (252).

Mikroskopska, a posebno imunohistokemijska istraživanja staničnih populacija decidue ukazala su na prisustvo, i po broju i po funkciji, vrlo značajne limfocitne subpopulacije **velikih granuliranih limfocita** (engl. large granulated lymphocytes - LGL). Ove stanice posjeduju u citoplazmi glikogenom bogata granula koja su vrlo osjetljiva na smrzavanje. Granula

pokazuju specifični afinitet prema floksin- tartrazinskoj boji (28, 186). Veliki granulirani limfociti osebujna su limfocitna subpopulacija čije stanice na površini membrane nose receptor za E-rozete (CD2+), dok im nedostaje obilježje zrelih T limfocita (CD3-). Neki autori misle da su ove stanice (CD2+, CD3-) modificirani endometrijski stromalni granulociti (25). Veliki granulirani limfociti su CD16- (ne reagiraju s monoklonskim antitijelima na markere NK stanica Leu-7 i Leu-11), ali CD56+ (intenzivno reagiraju s anti NKH-1 antitijelima), što je karakteristično za sve stanice tipa velikih granuliranih limfocita periferne krvi, uključujući i NK stanice (195). Velike granulirane limfocite (CD2+, CD3-, NKH- 1+) može se naći posvuda u decidui, ali najčešće u blizini spiralnih arteriola i endometrijskih žlijezda. Iako granulirani limfociti humane decidue jako slične subpopulaciji granuliranih limfocita periferne krvi (Leu-7+, CD16-) (136), zasad nema dokaza za izravni prijelaz granuliranih limfocita iz periferne krvi u decidualno tkivo (22). Obavezno prisustvo spomenutih stanica u stromi sekrecijskog endometrija i decidui rane trudnoće (u drugom tromjesečju broj im se smanjuje) ukazuje na njihovu važnu, zaštitnu ulogu u fazi implantacije blastociste i ranim fazama razvoja posteljice. Supernatant kultiviranih decidualnih LGL stanica ima stimulacijski učinak na proliferaciju stanica humane posteljice u prvom tromjesečju trudnoće (22). Supresiju prema majčnim imunokompetentnim stanicama u mišjoj i humanoj decidui pokazuju još i mali granulirani limfociti (59, 218, 219) koji, kao ni LGL stanice, ne nose markere zrelih T limfocita, ali u miša posjeduju Fc receptor za imunoglobulin G (220). Njihovo pojavljivanje u decidui povezuje se s indukcijskom ulogom trofoblasta (220, 221). Budući da se mali granulirani limfociti nalaze samo u horiodecidualnom spoju, njihova imunosupresijska aktivnost dovodi se u vezu s očuvanjem semialogeničke embrioplacentne jedinice od imunološke reakcije odbacivanja (59).

U pokusima s kulturama stanica humane decidue otkriveni su u supernatantu solubilni faktori s imunosupresijskom aktivnosti (91, 152, 244), koji dodatno pojačavaju ukupni lokalni supresijski učinak decidualnog tkiva



prema imunokompetentnim stanicama majčinog organizma. Koliki je udio pojedinih leukocitnih subpopulacija u ukupnom supresijskom učinku decidue ostaje zasad neriješeno. Makrofagi, supresijski/citotoksični T limfociti (CD3+, CD8+), mali i veliki granulirani limfociti (CD2+, CD3-, NKH-1+) humane decidue, vrlo je vjerojatno, glavni su nositelji lokalne imunosupresijske aktivnosti. Druge neleukocitne decidualne stanice samo upotpunjuju paletu stanica koje sudjeluju u regulaciji imunoodgovora majčinog organizma.

Određivanje vrsta i zastupljenosti pojedinih leukocitnih linija u humanoj decidui povezano je s nizom poteškoća (83, 99, 251). To se prvenstveno odnosi na metodologiju uzimanja materijala za imunološke pretrage. U cilju rješavanja ovog problema napredak smo postigli primjenom originalne bioptičke metode uzimanja uzoraka decidue u intaktnih trudnoća prvog tromjesečja (150) i imunohistokemijskom identifikacijom pojedinih leukocitnih subpopulacija u dobivenom bioptičkom materijalu. Teže je, međutim, riješiti pitanje osjetljivosti decidualnih leukocita na mehanička i enzimatska oštećenja prilikom pripravljanja suspenzija stanica iz decidualnog tkiva.

#### **1.4.3. Supresijska aktivnost stanica decidue**

Uobičajeno preživljavanje i rast embrija/fetusa u organizmu majke navelo je brojne autore na razmišljanje o posebnostima lokalnih uvjeta na spoju majčinih i fetalnih tkiva. Korak dalje u izučavanju ove problematike učinili su autori pokazavši da se alogeni kalem transplantiran u hormonski pripremljen endometrij održava značajno duže nego kalem stranog tkiva izvan maternice (9, 158, 204). Mnoge ranije teorije o maternici kao imunološki povlaštenom organu i značajnoj redukciji limfne drenaže kroz periuterine regionalne limfne čvorove ustupile su mjesto novim saznanjima o fetomaternalnim imunološkim odnosima.

Općenito se može reći da u imunološkoj reakciji organizma majke prema fetalnom alotransplantatu prevladavaju facilitacijski imunološki mehanizmi nad mehanizmima odbacivanja. Ne samo da ne dolazi do smanjenog prometa limfatičkih stanica kroz regionalne drenažne limfne čvorove, već je dokazano da se oni i povećavaju. U alogeničkim trudnoćama u miševa smanjuje se sposobnost pretvorbe T limfocita drenažnih limfnih čvorova u citotoksične T limfocite, kao i njihova djelotvornost u reakciji kalema protiv domaćina (engl. graft vs host reaction) u odnosu na T limfocite iz drugih limfatičnih organa (49). Smanjeno stvaranje citotoksičnih T limfocita u regionalnim limfnim čvorovima vjerojatno je rezultat aktivnosti malih supresijskih stanica (7 mikrometara u promjeru) koje nemaju Thy1 - klasični marker T limfocita. Spomenute stanice otpuštaju u kulturi stanica solubilne molekule koje pokazuju supresijsku aktivnost (50, 219). U pokusima je dokazano da je ova supresijska aktivnost nespecifična, jer je usmjerena i na druga alogenička tkiva, a ne samo na semialogeničke fetuse (57). Proučavanjem mišje decidue našlo se da decidualne supresijske stanice pokazuju svojstva istovjetna već opisanim supresijskim stanicama drenažnih periuterinih limfnih čvorova (sedimentiraju 3 mm/sat, ne nose klasične markere T limfocita, a solubilni faktori koje izlučuju imaju supresijsku aktivnost u in vitro uvjetima) (219). Lokalna supresijska aktivnost na razini gravidne maternice miša dovodi se u vezu i s malim limfoidnim stanicama s granuliranom citoplazmom (218) oko mjesta implantacije blastociste. Značaj specifične lokalne supresije najbolje prikazuju pokusi na različitim vrstama miševa *Mus musculus* i *Mus caroli*. Istovremeno s implantacijom embrija miša *Mus caroli* u jedan rog maternice miša *Mus musculus* implantiran je u drugi rog maternice i alogenički embrio. Decidua u rogu maternice *Mus musculus* s ksenogeničnim embrijem sadržavala je značajno manju koncentraciju malih granuliranih limfocita u odnosu na deciduu u drugom rogu maternice istog miša s alogeničkim embrijem. Shodno tome, značajno smanjena ili potpuno odsutna supresijska aktivnost decidue u prvom rogu bila je uzrokom odbacivanja ploda *Mus caroli* petog dana trudnoće, dok se

alogenički plod u drugom rogu maternice dalje nesmetano razvijao (57). Ista opažanja o važnosti lokalne stanične supresije za održavanje trudnoće opisana su i u alogeničkim kombinacijama mišjih sojeva (41).

Clark i sur. (52) mišljenja su da u području implantacijskog mjesta trofoblast inducira pojavu imunosupresijskih stanica odgovornih za specifičnu lokalnu staničnu supresijsku aktivnost. Ovo bi moglo objasniti već potvrđenu činjenicu da stanična imunosupresija na razini decidue specifično štiti trofoblast i embrio od imunološkog odbacivanja i da isti imunosupresijski mehanizmi ne mogu spriječiti sve vrste imunološkog odbacivanja alogeničkog tkiva (218). Za upoznavanje i razumijevanje lokalne specifične imunosupresijske aktivnosti posredovane decidualnim stanicama potrebno je najprije ispitati vrste, zastupljenost i rasprostranjenost imunokompetentnih stanica decidue, a zatim i njihove funkcijske osobine.

### **1.5. PATOLOŠKE TRUDNOĆE PRVOG TROMJESEČJA**

Patološke trudnoće nisu rijetka pojava u humanoj reprodukciji (114, 243). Do ovih podataka došlo se uvođenjem vrlo osjetljivih i visoko specifičnih metoda pretraga (161, 194). Serijskim određivanjem serumskih koncentracija beta podjedinice humanog horiogonadotropina (beta-hCG) u žena s tek nekoliko dana izostalom menstruacijom zaključilo se da približno 40% produkata oplodnje spontano propada i prije nego što žena sazna da je trudna (156, 165). Daljnjih 20% trudnoća, nakon što su otkrivene nekom od metoda dijagnostike rane trudnoće, završava smrću embrija i spontanim pobačajem prije isteka prvog tromjesečja trudnoće (115, 187). Kad se u obzir uzmu i trudnoće na ektopičnim mjestima u organizmu žene, cijeli ovaj segment humane reprodukcije (patološke trudnoće) postaje neobično važan i zanimljiv. Uvjetno rečeno, radi se o nemilim pokusima prirode koja se poigrala s jedinkama ljudske vrste. Prisutna je, međutim, ideja da ćemo proučavajući slučajeve patoloških trudnoća moći bolje proniknuti u temeljne postavke i pravila koja vladaju u humanoj reprodukciji, prije svega, biološke

mehanizme zaštite alogeničkog ploda od imunokompetentnog majčinog organizma. Pritom treba napomenuti da je skupina patoloških trudnoća prilično heterogena, a da je ono što povezuje pojedine vrste, nažalost, loš krajnji ishod trudnoće.

### **1.5.1. Uzroci spontanih pobačaja u humanoj reprodukciji**

U etiologiji spontanih pobačaja prvog tromjesečja navode se genetski poremećaji u roditelja (85, 86, 87, 89, 103, 141, 217), kromosomske abnormalnosti produkata koncepcije (19, 75, 123, 217, 230, 232), endokrinološki poremećaji (53, 99, 233), sistavne bolesti organizma žene (89, 90, 95, 144, 203, 237, 253), iradijacija, razne intoksikacije, neki lijekovi, psihički stres (138) te, na lokalnoj razini (fetomaternalnom spoju), hemodinamski (123, 198) i imunološki poremećaji (66, 67, 99, 100, 168, 226). Teško je, međutim, govoriti o učestalosti navedenih uzroka u pojedinim slučajevima spontanih pobačaja. Autori koji su citogenetski analizirali stanice pobačenih produkata koncepcije, ustanovili su u preko 40% slučajeva kromosomske abnormalnosti (19, 75, 114). Drugi poznati uzroci prisutni su u sljedećih 20% spontanih pobačaja, dok se za preostale etiološki nerazjašnjene slučajeve spontanih pobačaja okrivljuju, između ostalog, imunološki činitelji. To je i logično, jer su embrio i trofoblast zbog polovice svojih genskih produkata naslijeđenih od oca, prirodne imunološke mete za imunokompetentne stanice majčinog organizma (113, 121).

Iako spontani pobačaji pokazuju sličnosti s imunološkom reakcijom odbacivanja transplantata (45), u ljudi postoji zasad malo sigurnih dokaza za imunološku etiologiju spontanih pobačaja, pa gotovo sve ostaje na teorijskim razmatranjima.

### 1.5.2. Imunološki mehanizmi kao potencijalni uzroci spontanih pobačaja

Više činjenica govori u prilog moguće imunološke etiologije spontanih pobačaja, naročito habitualnih. Nasuprot činjenici da je za normalan razvoj trudnoće potrebna heterogenost između očevih i majčinih HLA- i TLX-antigenskih sustava, neki su autori sličnost roditeljskih HLA- haplotipova i TLX-antigena proglasili mogućim predisponirajućim činiteljem habitualnih pobačaja (10, 11, 103, 156, 188, 239). Postavljena je, naime, hipoteza da spontane pobačaje uzrokuje nedostatno ili izostalo stvaranje antitijela koja blokiraju majčinu imunološku reakciju prema plodu (200, 226, 240). Takvo izostajanje blokirajuće aktivnosti je i dokazano u reakciji pomiješanih limfocita (MLR) u žena s ponavljanim pobačajima (11, 15, 200, 233, 240). Sama priroda serumskog faktora koji je odgovoran za MLR inhibiciju (iako se pretpostavlja da je antitijelo) nije, međutim, u potpunosti definirana (99). Kasnije se utvrdilo da MLR inhibiciju nije moguće uvijek dokazati ni u žena u kojih se s velikom vjerojatnosti sumnja na imunološki uzrok pobačaja (207). S druge strane, izostajanje sustavne blokirajuće aktivnosti kao eventualni uzrok ponavljanih spontanih pobačaja također je proturječno, budući da ni u svih žena s uredno iznešenom trudnoćom nisu bile pronađene spomenute blokirajuće tvari (73, 175, 201). Isto tako, mali postotak trudnica proizvodi antitijela protiv paternalnih HLA antigena (2). Zbog svega navedenog, stvaranje antipaternalnih citotoksičnih antitijela ne može biti koristan ni praktično uporabljiv marker u obradi parova s ponavljanim spontanim pobačajima (192). Većina autora koji su u skupini žena s nekoliko urednih poroda i u skupini žena s ponavljanim spontanim pobačajima ispitivali izostanak blokirajuće aktivnosti kao uzrok pobačajima misli da su dobivene razlike između navedenih skupina ispitanica vjerojatno proizašle iz činjenice da su jedne žene više puta rodile, nego što bi te razlike bile uzrok ponavljanim pobačajima u drugih žena (207). Nepostojanje HLA antigena klase I na površini sinciciotrofoblasta, prisustvo atipičnih HLA antigena na

stanicama citotrofoblasta te potpuno odsustvo HLA determinanti klase II na svim stanicama trofoblasta isključuju ulogu trofoblasta bilo kao klasičnog imunogena za senzibilizaciju majke, bilo kao mete za citotoksične T limfocite upravljene na HLA antigene (99). Ekspresiju HLA antigena klase I na citotrofoblastu može se, međutim, inducirati gama-interferonom koji produciraju T limfociti (79, 92). U endometriju nekih žena s ponavljanim spontanim pobačajima češće se opažaju upravo T limfociti pa bi njihovom aktivacijom izlučeni gama-interferon (gama-IFN) mogao inducirati ekspresiju HLA antigena klase I i tako pokrenuti imunološki mehanizam citotoksične T stanične aktivnosti (223) čiju bi kulminaciju predstavljao spontani pobačaj.

Pored spomenutih sustavnih imunoloških poremećaja koji mogu doprinijeti nastanku spontanih pobačaja, mnogi su znanstvenici svoju istraživačku energiju usmjerili na imunološke promjene koje se odvijaju na lokalnoj razini - **embriomaternalnom spoju**.

Čim se pretpostavilo da bi decidualne supresijske stanice i supresijski činitelji mogli biti važni za uspješnost trudnoće, postavljena je hipoteza o odsustvu spomenutih stanica i činitelja kao mogućem uzroku spontanih pobačaja. Tako je na mišjem modelu pokazano da u decidui već prije početka spontanog pobačaja počinje slabiti aktivnost supresijskih stanica (46). Rezultati pokusa na miševima i štakorima ne mogu se, istina, u potpunosti primjeniti u humanoj reprodukciji. Navedene teorije, međutim, potvrdile su kliničke studije slučajeva propalih trudnoća nakon izvanmaternične oplodnje i transfera humanog embrija (172). U decidui miša nakon resorpcije oplodenog jajašca značajno je smanjen broj supresijskih stanica u ukupnom infiltratu mononuklearnih stanica (59). Smanjenje broja supresijskih stanica u decidui također je nađeno u žena s odumrlim plodom u prvom tromjesečju trudnoće (engl. missed abortion) (163) Isti autori našli su povećani broj T limfocita u endometriju nakon biopsije u žena koje nisu trudne, a u anamnezi navode spontane pobačaje u odnosu na kontrolnu skupinu žena urednog fertiliteta. Uspoređujući skupinu žena sa spontanim pobačajima i skupinu žena u kojih je izvršen elektivni prekid rane trudnoće,

Hill i sur. su u prvoj skupini našli pojačanu aktivaciju i funkcije decidualnih makrofaga (99). To je i razumljivo jer su u normalnoj trudnoći aktivacija i funkcije decidualnih makrofaga suprimirane (99, 102). Teško je reći da li su dosad navedene činjenice uzrok ili posljedica spontanog pobačaja. Potrebne su daljnje proširene imunološke studije koje bi trebale pokazati da li postoje razlike u vrsti, rasprostranjenosti i funkciji imunokompetentnih stanica u decidui žene s etiološki nerazjašnjenim pobačajima u usporedbi s onim ženama u kojih se s velikim postotkom sigurnosti pretpostavlja neki poznati uzrok pobačaja. Studije bi, nadalje, trebale odgovoriti i na pitanje da li takve razlike postoje između decidue žena koje po prvi put spontano pobacuju u odnosu na deciduu u žena u kojih se elektivno prekinula normalna trudnoća.

Mnogi od citokina (monokini i limfokini), kao što je pokazano u pokusima in vitro, sudjeluju aktivno u reprodukcijском procesu, uključujući razvoj embrija (102) i rast trofoblasta (6, 119, 246). Zbog toga se i pomišlja na njihovu eventualnu štetnu ulogu u imunološki uvjetovanom infertilitetu i slučajevima ponavljanih spontanih pobačaja (99). Na primjer, monokini mogu postati citotoksični (neposredno ili posredno) i bez prisustva HLA antigena (kojih na površini trofoblasta niti nema), budući da za aktivaciju makrofaga prisustvo HLA antigena nije obavezno. Pomagački T limfociti programirani od aktiviranih makrofaga, mogu se isto tako aktivirati i izlučivati limfokine, bez da u proces aktivacije budu uključene stanice s površinskim antigenima klase I ili II. Teoretski je, dakle, u oba slučaja dovoljna samo aktivacija makrofaga. Makrofage u decidui mogu aktivirati trofoblastni antigeni i/ili spermalni antigeni koji se nalaze na površini embrija ili trofoblasta u ranom stadiju razvoja (99). Pored toga, aktivaciju makrofaga mogu inducirati i stimulirati bakterijske i virusne infekcije (99, 134). Aktivirani makrofagi izlučuju monokine, od kojih faktor nekroze tumora (engl. tumor necrosis factor - TNF) može neposredno inhibirati razvoj embrija i proliferaciju trofoblasta, što je u pokusima in vitro i dokazano (12, 102, 147). I drugi solubilni faktori koje otpuštaju aktivirani makrofagi/monociti, kao što su slobodni radikali kisika,

prostaglandini, vodikov peroksid i lizozimi, mogu imati štetni učinak na ranu trudnoću (4). Aktivirani makrofagi stvaraju i izlučuju monokin interleukin-1 (IL-1) koji ima važnu ulogu u započinjanju imunološkog odgovora, budući da stimulira izlučivanje limfokina interleukin-2 (IL-2) iz aktiviranih pomagačkih T limfocita koji su brojni u humanoj maternici (99). Osim spomenute uloge, monokin IL-1 može posredno oštetiti fetoplacentnu jedinicu tako što povećava sposobnost vezivanja prirodnih stanica ubica (prirodne NK stanice) s posljedičnom lizom (98). K tome, oslobođeni IL-2 dodatno stimulira NK stanice i druge aktivirane stanice ubice i tako pojačava učinak lize na fetoplacentnu jedinicu (184). Interleukin-2 amplificira dalje kaskadnu reakciju citokina tako što stimulira druge IL-2 ovisne limfocite, uzrokujući sekreciju i drugih limfokina (65, 99). Jedan od njih, gama-IFN, kao što je već spomenuto, može inducirati ekspresiju HLA antigena klase I na trofoblastu i tako olakšati aktivaciju i privlačenje citotoksičnih T limfocita (79, 146, 223). Osim posrednih učinaka - aktivacije makrofaga (210) i intenziviranja NK aktivnosti (236), gama-IFN ima i neposredne ubilačke učinke na stanice embrija i trofoblasta in vitro (12). GM-CSF je drugi limfokin kojeg otpuštaju od IL-2 aktivirani T limfociti, i koji, izgleda, može in vitro inhibirati razvoj embrija i proliferaciju trofoblasta (12). Prema drugim autorima (6, 119, 246) GM-CSF stimulira proliferaciju mišjeg trofoblasta in vitro (imunotropizam). Faktor rasta B limfocita (BCGF) koji se sada zove interleukin-4 (IL-4), još je jedan u nizu limfokina koje produciraju aktivirani T limfociti. Spomenuti IL-4 može inducirati proliferaciju i diferencijaciju B limfocita u plazma stanice koje su tada sposobne proizvoditi antitijela (160). Hipoteza o solubilnim produktima aktiviranih imunih stanica koji mogu inducirati imunodistrofizam još je nedovoljno ispitana, ali nudi potencijalno nove mehanizme nastanka imunoloških poremećaja reprodukcije. Vrijednost nove teorije potrebno je provjeriti kliničkim studijama. Preliminarne studije pokazale su da trofoblastni i spermalni antigeni mogu barem u nekih žena s ponavljanim spontanim pobačajima stimulirati makrofage i limfocite na izlučivanje solubilnih produkata koji su, in vitro, toksični za embrio i trofoblast (99, 102, 147). Za



dokazivanje faktora odgovornih za toksičnost prema embrioplacentnoj jedinici potrebne su također kliničke studije.

U serumu žena s više spontanih pobačaja primjećeno je prisustvo cirkulirajućih spermatozoid - aglutinirajućih ili imobilizirajućih antitijela (93, 109) i citotoksičnih ili hemaglutinirajućih antitijela (151). Ni svi autori koji su se bavili tim problemom nisu, međutim, uspjeli potvrditi povezanost spomenutih antitijela sa slučajevima spontanih pobačaja, vjerojatno zbog različitih metodoloških pristupa. Nedavno je opažena povezanost između imobilizirajućih antitijela koja reagiraju s površinskim antigenima živih, pokretnih spermatozoida i habitualnih pobačaja. To ukazuje na mogućnost da su antispermalna antitijela uključena u patofiziološke mehanizme nastanka spontanih pobačaja ili da predstavljaju marker oslabljene imunosupresijske aktivnosti u žena s ponavljanim spontanim pobačajima (250).

Smrt embrija obično završava spontanim pobačajem odnosno spontanom ekspulzijom odumrlog oplodjenog jajašca u prvom trimestru trudnoće (243). Prepoznavanje smrti embrija prije spontane ekspulzije iz maternice olakšano je uvođenjem ultrazvučne dijagnostike u svakodnevnu ginekološku praksu (189). Osim toga, ultrazvučna metoda pregleda pomaže potvrditi činjenicu da spontani pobačaj kao klinička kategorija nije ni etiološki niti morfološki homogena skupina. Tako se pod pojmom patološke trudnoće podrazumjeva nekoliko kliničko - morfoloških entiteta (vidi poglavlje MATERIJAL I METODE).

## 1.6. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ideja o intrauterinoj imunoregulaciji kao temelju normalnog i uspješnog razvoja embrioplacentne jedinice potakla je mnoge znanstvenike da istražuju endometriju i deciduu koja u trudnoći oblaže unutrašnjost maternice i u neposrednom je dodiru s prirodno implantiranim oplođenim jajašcem. Iako su u trudnoći primjećene imunološke sustavne promjene koje bi mogle utjecati na održavanje trudnoće, intenzivna imunološka zbivanja na razini embriomaternalnog i, kasnije, fetomaternalnog spoja (engl. embriomaternal/fetomaternal interface) pobuđuju sve više pozornost mnogih istraživača. Pozornost je pritom usredotočena na decidualni stanični imunološki odgovor, odnosno na karakterizaciju imunokompetentnih stanica decidue, njihovu rasprostranjenost i funkcijsku sposobnost u normalnoj trudnoći. Boljem razumijevanju imunoregulacijskih procesa na lokalnoj, decidualnoj razini moglo bi doprinijeti i proučavanje eventualnih imunoloških uzroka spontanih pobačaja, tih neugodnih i nemilih eksperimenata prirode.

Proučavajući slučajeve patoloških trudnoća nastojat ćemo ostvariti temeljni cilj istraživanja - proniknuti u lokalne imunobiološke odnose i mehanizme odgovorne za preživljavanje i razvoj embrioplacentne jedinice. Zato smo postavili nekoliko istraživačkih zadataka.

Najprije želimo na našem materijalu provjeriti činjenicu o većoj učestalosti kromosomskih poremećaja u spontano pobačenih plodova u odnosu na plodove iz normalnih umjetno prekinutih trudnoća i živorođenu normalnu djecu. Rezultate citogenetske obrade tkiva pobačenih plodova posebno ćemo analizirati s obzirom na pojedine vrste patoloških trudnoća (vidi MATERIJAL I METODE).

Sljedeći i najvažniji zadatak bit će identifikacija i karakterizacija leukocita humane decidue u patološkim trudnoćama prvog tromjesečja. Kako su prethodne imunohistološke studije isključivo rađene na materijalu nakon kiretaže maternice, značajnim poboljšanjem smatramo ispitivanje vrsta, karakteristika i distribucije decidualnih leukocita pomoću monoklonskih

antitijela na bioptičkom materijalu. Prethodno smo, naime, razvili originalnu i sigurnu metodu biopsije decidue (150) koja nam je već omogućila odgovor na pitanje postoje li razlike u vrstama, broju i raspodjeli leukocita između bazalne i parijetalne decidue. Da bi utvrdili antigenske karakteristike i brojčanu zastupljenost pojedinih limfocitnih subpopulacija u suspenziji limfocita decidue iz patoloških trudnoća prvog tromjesečja, prethodno smo razvili postupak dobivanja suspenzije decidualnih leukocita iz decidualnog tkiva i adherencijom za podlogu iz nje odstranili decidualne makrofage. Ovakav način rada omogućit će nam da ustanovimo eventualne razlike u vrsti i/ili udjelu pojedinih subpopulacija decidualnih limfocita s obzirom na vrstu patološke trudnoće. Štoviše, poznavajući morfološke osobitosti pojedinih vrsta patoloških trudnoća, pokušat ćemo izvesti zaključke o eventualnom utjecaju trofoblasta na sastav leukocitnog miljea u humanoj decidui.

Odvajanjem adherentne i neadherentne frakcije stanica iz suspenzije decidualnih leukocita moći ćemo odvojeno istražiti reaktivnost decidualnih makrofaga i decidualnih limfocita na poliklonske mitogene i aloantigene.

Tako ćemo ispitivati i međusobno uspoređivati spontanu proliferaciju limfocita periferne krvi, decidualnih limfocita i decidualnih makrofaga u odvojenim i pomiješanim kulturama, kao i stimulacijski učinak poliklonskih mitogena na rast spomenutih staničnih populacija. Dobivene rezultate uspoređivat ćemo po skupinama ispitivanih patoloških trudnoća i, također, u odnosu na skupinu normalnih trudnoća.

Utjecaj decidualnih limfocita i decidualnih makrofaga na proliferaciju singeničkih limfocita periferne krvi stimuliranu poliklonskim mitogenima i aloantigenima, u testovima blastične transformacije odnosno kulturama pomiješanih limfocita, postavili smo za svoj sljedeći važan zadatak. I ovaj put obradit ćemo rezultate po skupinama ispitivanih patoloških trudnoća, a zatim ih usporediti međusobno i u odnosu na rezultate iz skupine normalnih trudnoća.

Uspoređivanjem rezultata imunohistološke studije, analize suspendiranih limfocita u protočnom citometru i funkcionalnih imunoloških ispitivanja za skupinu izvanmaterničnih trudnoća s jedne strane, i ostalih vrsta patoloških trudnoća i normalne trudnoće s druge strane, možda ćemo biti u prilici utvrditi eventualnu ulogu trofoblasta u indukciji supresijske aktivnosti decidualnih T limfocita.

Cilj nam je, a i želja, da se ovom studijom uključimo u nastojanja mnogih znanstvenika širom svijeta koji rade na polju imunologije reprodukcije i da svojim rezultatima pridonosimo boljem i pravilnijem razumijevanju prirodnih, lokalnih imunobioloških mehanizama koji postoje između majke i embrija/fetusa.

## 2. MATERIJAL I METODE

Decidualno tkivo za imunohistokemijske i imunološke funkcionalne pretrage dobivali smo prilikom prekida patoloških trudnoća u prvom tromjesečju. Sve pacijentice s patološkom trudnoćom bile su hospitalizirane na Klinici za ginekologiju i porodništvo Kliničkog bolničkog centra RIJEKA u Rijeci. Dob ispitivanih trudnoća određena je na osnovi datuma zadnje menstruacije i nalaza ultrazvučne pretrage.

### 2.1. VRSTE ISPITIVANIH PATOLOŠKIH TRUDNOĆA

Na osnovi anamnestičkih podataka o tijeku trudnoće, ponavljanih ultrazvučnih pregleda i hormonskih pretraga (beta-hCG) podijelili smo patološke trudnoće u dvije osnovne skupine: **spontani pobačaji i ektopične trudnoće.**

Klinička kategorija spontanih pobačaja etiološki i morfološki vrlo je heterogena pa smo unutar nje razlikovali nekoliko oblika patoloških trudnoća:

**Blighted ovum** - u prijevodu vještičje jaje ili vještičja trudnoća, označava oblik patološke trudnoće u kojoj se, najčešće zbog genetske greške produkta oplodnje, plod uopće ne razvija (189). Trofoblastno tkivo, međutim, preživljava i raste, trudnoća napreduje, da bi se ipak nakon nekog vremena pojavili znaci prijetecjeg spontanog pobačaja. Utvrđivanje spomenutog oblika patološke trudnoće u domeni je ultrazvučne dijagnostike, pri čemu se dijagnoza najčešće postavlja nakon dva ili više ponavljanih ultrazvučnih pregleda prilikom kojih se identificira odsustvo ploda unutar gestacijske vrećice. Mnogi autori (74, 189) smatraju blighted ovum pretečom mole hidatidoze. Ako se nakon ultrazvučne dijagnoze dovoljno rano pristupi evakuaciji šupljine maternice, nalazi se u potpunosti očuvano trofoblastno i decidualno tkivo.

**Mola hydatidosa** - naročita je vrsta patološke trudnoće koju neki svrstavaju u neoplastičke procese (13, 142). Histološke karakteristike mole hidatidoze su proliferacija trofoblasta, edem horionskih resica i redukcija/odsustvo fetalnih krvnih kapilara u stromi horionskih resica (183, 230). Na osnovi citogenetskih i morfoloških karakteristika razlikuju se najmanje dva oblika hidatidoznih mola: kompletna (klasična) mola hidatidoza s karakterističnim patološkim diploidnim kariotipom 46,XX ili 46,XY, pri čemu su obje haploidne garniture kromosoma očevog porijekla i parcijalna mola hidatidoza kod koje se najčešće nalazi triploidija 69,XXY, pri čemu su dvije haploidne garniture kromosoma porijeklom od oca (141, 230, 232). Zbog mnogih citogenetskih i kliničko- morfoloških sličnosti s blighted ova, mola hidatidoza se može shvatiti njihovim kasnijim stadijem (74).

**Missed abortion** - iako se prema klasičnoj definiciji radi o trudnoći s mrtvim plodom koji zaostaje u maternici duže od četiri tjedna (189), mi smo pod spomenutim oblikom patološke trudnoće podrazumjevali sve slučajeve ultrazvučno dijagnosticirane smrti ploda (embrio bez srčane akcije) bez obzira na vrijeme proteklo od smrti ploda do konačne dijagnoze. Missed abortion u početku se manifestira kliničkim znacima prijetjećeg pobačaja. Krajnji ishod trudnoće je spontani pobačaj odumrlog i najčešće nekrotičnog tkiva oplodjenog jajašca (plod i trofoblast) i decidue (243).

**Ponavljani spontani pobačaji** - kako sam naziv govori, radi se o nekoliko spontanih pobačaja podjednake gestacijske dobi, koji se zaredom javljaju u iste žene (53, 187, 243). Unutar ovako definirane kliničke skupine spontanih pobačaja obično se, međutim, ne pravi razlika između etiološki i morfološki različitih oblika patoloških trudnoća (misli se na missed abortion, blighted ovum i molu hidatidozu). Ova skupina posebno je zanimljiva, jer uz poznate anatomske, genetske, hormonske i psihičke poremećaje u žene mnogi autori pretpostavljaju i imunološke uzroke nastanka ponavljanih spontanih pobačaja (37, 85, 162).

Pod pojmom normalne trudnoće podrazumjeva se, između ostalog, i intrauterino sijelo trudnoće, budući da samo ono omogućuje normalan razvoj i napredovanje trudnoće. **Ektopična trudnoća** naziv je za trudnoću koja je patološka samo po svom sijelu (72), budući da se trofoblast razvija izvan šupljine maternice. Za našu studiju ova je vrsta patološke trudnoće naročito zanimljiva zbog odsustva neposrednog kontakta između decidue i trofoblasta koji se, kako je rečeno, razvija izvan maternice. Ektopična trudnoća a priori je osuđena na propast zbog nepovoljnih uvjeta implantacijskog mjesta. U slučaju tubarne trudnoće, naime, agresivni trofoblast invadira stijenku jajovoda, pri čemu oštećuje i krvne žile pa ženi prijete smrt od iskrvarenja.

Činilo nam se korisnim u kratkim crtama navesti posebnosti pojedinih vrsta patoloških trudnoća koje smo obuhvatili našom studijom, budući da navedenu podjelu smatramo relevantnom za interpretaciju rezultata imunoloških istraživanja.

Promatrajući lokalne uvjete unutar maternice i navedene osnovne značajke pojedinih oblika patoloških trudnoća, s imunološkog aspekta postaje značajno sljedeće: u slučajevima missed abortion nesumnjivo postoje znaci odbacivanja mrtvog i najčešće propalog produkta koncepcije (prototip reakcije HVG), u trudnoćama kao što su blighted ovum i mola hydatidosa trofoblast preživljava i nesmetano se razvija kao u normalnim trudnoćama, a u slučajevima ektopičnih trudnoća, za razliku od intrauterinih, izostaje neposredni kontakt decidue i trofoblasta i njegov eventualni utjecaj na promjene u decidui.

## **2.2. CITOGENETSKA ANALIZA TKIVA POBAČENIH PRODUKATA OPLODNJE**

Prilikom instrumentalne evakuacije šupljine maternice u slučajevima patoloških trudnoća (izuzev ektopičnih) uzimali smo na sterilan način trofoblastno i/ili embrionalno tkivo za citogenetsku analizu. Dobivene uzorke tkiva odmah smo pohranili u sterilni hranjivi medij RPMI 1640 (Imunološki

zavod Zagreb). Citogenetska analiza tkiva spontano pobačenih produkata oplodnje izvršena je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. Ispitali smo učestalost patoloških citogenetskih nalaza u slučajevima spontanih pobačaja prvog tromjesečja trudnoće.

Stanice pobačenog ploda kultivirali smo u 20% hranilištu (teleći serum i RPMI 1640) na temperaturi od 37°C. Nakon dva do tri tjedna zaustavljali smo dijeljenje stanica dodavanjem otopine kolcemida (10 µg/ ml) u otopinu. Odljepljivanje stanica od podloge postizavali smo pomoću 0,025% otopine tripsina. Stanice smo kasnije tretirali hipotoničnom otopinom (0,075 M KCL) kroz 30 minuta a zatim i metanol octenom kiselinom (u omjeru 1:3) dva do tri puta. Citogenetsku analizu kromosoma izvršili smo pomoću G - metode pruganja (GTG).

### **2.3. BIOPSIJA I KIRETAŽA DECIDUALNOG TKIVA**

Nakon anesteziološke pripreme pacijentice (opća intravenska anestezija) i dezinfekcije vanjskog spolovila, uvodili smo pod kontrolom ultrazvuka metalna bioptička kliješta (MARTIN; Oldberg 24 996-25) u unutrašnjost maternice bez dilatacije cervikalnog kanala. Pomoću real-time ultrazvučnog aparata prethodno smo lokalizirali trofoblastno tkivo. Spomenuta bioptička kliješta uvodili smo pod najdeblji sloj trofoblasta i uzimali uzorak bazalne decidue, čije su dimenzije približno iznosile 5mm x 5mm x 3mm, upravo onoliko koliko je bio velik završni dio kliješta u obliku žlice (150). Postupak smo ponavljali sve dok nismo dobili tri odgovarajuća uzorka tkiva bazalne decidue. Za tri slična komadića tkiva parijetalne decidue proveli smo isti bioptički postupak, ali ovog smo puta uzorke tkiva uzeli sa stijenke maternice nasuprot implantacijskog mjesta. Komadiće tkiva bazalne i parijetalne decidue prekrivali smo krioprotektivnim medijem (OCT -Miles, Milano, Italy), a zatim brzo smrznavali u tekućem dušiku na minus 80°C gdje smo ih čuvali do uporabe. Nakon biopsije decidue i evakuacije trofoblasta iz unutrašnjosti maternice oštrom kiretom sastrugali bi decidualno tkivo koje



smo po nekoliko puta ispirali od primjesa krvi u sterilnoj fiziološkoj otopini istovremeno odstranjujući dijelove trofoblasta i embrionalnih ovojnica. Tako pripremljenu deciduu pohranili smo do trenutka obrade u epruvetu sa sterilnom fiziološkom otopinom na +4°C. Decidualno tkivo dobiveno biopsijom i smrznuto u tekućem dušiku upotrijebili smo za imunohistološka istraživanja koja smo proveli u Istituto per l'Infanzia - Trieste, Italia. Preostalu kiretažom dobivenu deciduu koristili smo za funkcionalne imunološke pretrage na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

#### **2.4. IMUNOHISTOLOGIJA**

Uzorke tkiva bazalne i parijetalne decidue prethodno smrznute u tekućem dušiku, rezali smo pomoću kriotoma na debljinu od 4 - 6 mikrometara. Rezove smo najprije sušili na zraku na sobnoj temperaturi, a zatim kroz sljedećih deset minuta na temperaturi od +4°C držali u fiksiru koji se sastojao od acetona i kloroforma pomiješanih u jednakim dijelovima. Tako fiksirane rezove tkiva odvojeno smo zamatali u staniol i čuvali u tekućem dušiku do upotrebe. Neposredno prije upotrebe uzorke smo izvadili iz tekućeg dušika, držali desetak minuta na zraku pri sobnoj temperaturi, a zatim po nekoliko puta ispirali u 0,005 M TBS (tris bufer saline; pH 7,5). Slijedila je 30-minutna inkubacija preparata najprije s razrijeđenim serumom koze (Histoimmune Immunostaining System, CHL, Ortho, Milano, Italy), a potom i s razrijeđenim monoklonskim antitijelima.

U Tablici 1. naveli smo sedam različitih monoklonskih antitijela koje smo koristili u tehnici indirektno imunoperoksidaze. Po završetku spomenute inkubacije preparate smo obrađivali pomoću reagensa iz originalnog kita Histoimmune Immunostaining pa onda inkubirali s diaminobenzidinom (DAB) kroz 5 - 9 minuta. Preparate smo potom ispirali fiziološkom otopinom, obojili pozadinu hematoksilinom (Mayer) i ponovno dva puta ispirali. Za analizu preparata koristili smo mikroskopsku mrežicu. Cilj nam je bio izbrojiti na

TABLICA 1. MONOKLONSKA ANTITIJELA ZA IMUNOHISTOLOŠKU ANALIZU

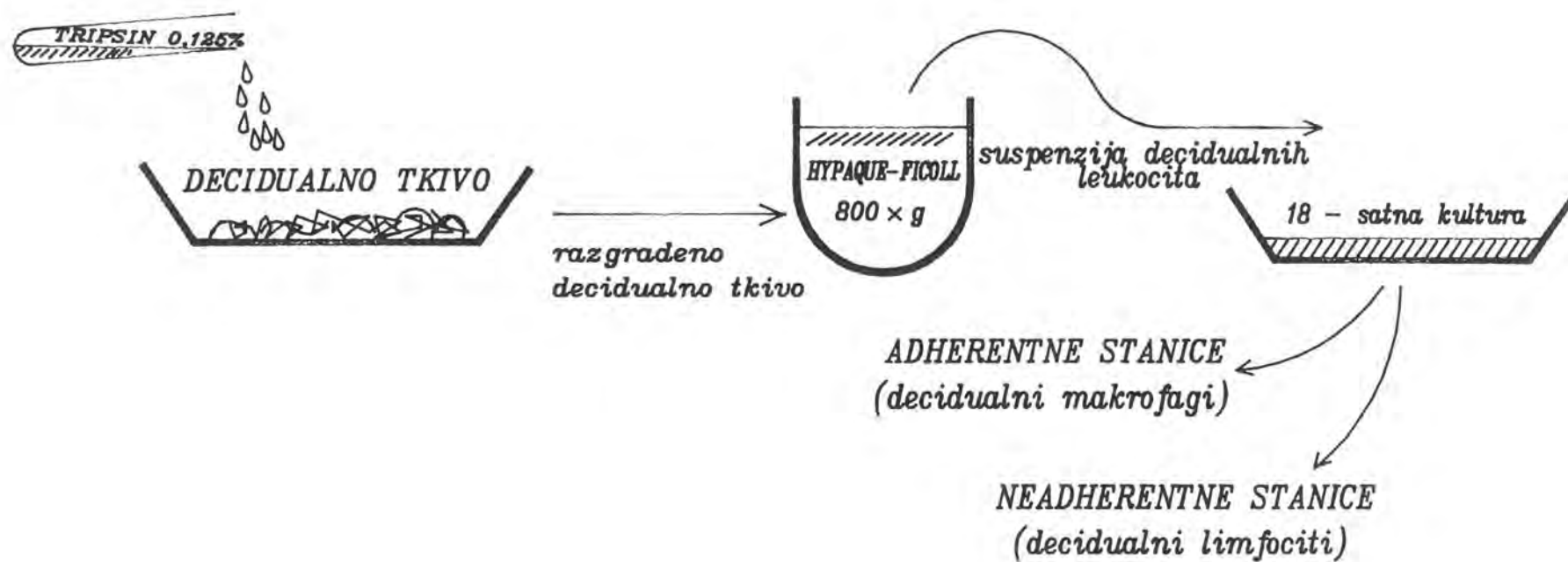
MONOKLONSKO ANTITIJELO	ANTIGEN	TVRTKA	RAZRIJEĐENJE
OKT11	CD2	Ortho	1:50
OKT3	CD3	Ortho	1:50
Leu 3a+3b	CD4	Becton Dickinson	1:2
OKT8	CD8	Ortho	1:50
NKH-1	CD56	Coulter	1:20
OKB7	CD21	Ortho	1:50
Anti Macrophages	makrofagi	Dako	1:20
Anti TCR delta 1	gamma/delta TCR T cell	Sciences	1:20

specifična monoklonska antitijela pozitivne stanice u 15 vidnih polja koja smo izabrali metodom slučajnog izbora. Prilikom mikroskopiranja koristili smo se povećanjem od 317 puta. Pozitivne stanice unutar limfatičkih folikula decidue nismo uzimali u obzir. Rezultate smo prikazali kao srednji broj pozitivnih stanica  $\pm$  pogreška aritmetičke sredine.

## **2.5. DOBIVANJE SUSPENZIJE LEUKOCITA IZ DECIDUALNOG TKIVA**

Decidualno tkivo iz normalnih i patoloških humanih trudnoća, dobiveno kiretažom ili aspiracijom i ostavljeno u sterilnoj fiziološkoj otopini, obrađivali smo na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. Materijal smo najprije više puta ispirali u RPMI 1640 (Imunološki zavod Zagreb) i istovremeno od njega odstranjivali sva onečišćenja (trofoblast, dijelove ploda i plodovih ovojnica, majčinu krv,...). Pročišćeno decidualno tkivo usitnjavali smo na komadiće do veličine od 1 - 2 mm<sup>3</sup> i potom uranjali u tripsinski medij (0,125% Trypsin DIFCO + EDTA). Uz neprestano miješanje smjese tkiva (približno 10 g) i tripsinskog medija u magnetskoj mješalici, proces enzimske digestije trajao je 90 minuta na 37°C. Svakih trideset minuta dodali bi po 10 ml svježeg tripsinskog medija do ukupne količine od 50 ml. Proces digestije prekidali smo dodatkom 10% humanog AB krvnog seruma u smjesu. Suspenziju stanica dvaput smo isprali u hladnom RPMI 1640 mediju. Netom isprane stanice nasložili smo na Hypaque- Ficoll te centrifugirali kroz sljedećih 20 minuta na 800x g. Na opisani način odvojene decidualne leukocite (u suspenziji) dvaput smo isprali u hladnom mediju, izbrojili stanice s jezgrom i odredili im vijabilnost pomoću tripsanskog modrila. Vijabilnost smo usporedno kontrolirali i prilikom FACS analize stanica u suspenziji decidualnih limfocita, pri čemu postotak mrtvih stanica nije smio biti veći od 10%.

SLIKA 1. POSTUPAK ENZIMATSKE RAZGRADNJE DECIDUALNOG TKIVA I IZDVAJANJE ADHERENTNE I NEADHERENTNE FRAKCIJE STANICA IZ SUSPENZIJE DECIDUALNIH LEUKOCITA



## **2.6. KULTIVACIJA DECIDUALNIH LEUKOCITA**

Decidualne leukocite u suspenziji, u koncentraciji od  $2 \times 10^6$  stanica/ml suspenzije, kultivirali smo u kompletnom RPMI 1640 mediju s dodatkom penicilina, streptomicina, tiamulina i L-glutamina obogaćenog s 5% telećeg seruma (engl. fetal calf serum - FCS; Serva). Plastične bočice od 50 ml (Grainer) u kojima smo ostavljali leukocite, inkubirali smo na  $37^{\circ}\text{C}$  u atmosferi s 5% ugljičnog dioksida i optimalne vlažnosti.

## **2.7. RAZDVAJANJE FRAKCIJA DECIDUALNIH LEUKOCITA**

Decidualne leukocite ostavili smo 18 sati u kulturi a zatim smo pipetiranjem oprezno odvojili neadherentne (decidualni limfociti) od adherentnih stanica. U kulturu smo zatim dodali nekoliko mililitara tripsinskog medija i pod invertnim mikroskopom promatrali odvajanje stanica od plastične podloge. Tripsinsku digestiju prekidali smo, kao i prilikom "tripsinizacije" decidualnog tkiva, dodatkom 10% humanog AB krvnog seruma. Tada smo ponovno pipetiranjem oprezno izdvojili preostale stanice iz kulture. Postupak odvajanja pojedinih frakcija leukocita iz decidualnog tkiva po fazama prikazuje Slika 1.

## **2.8. IDENTIFIKACIJA LEUKOCITNIH SUBPOPULACIJA U SUSPENZIJI LEUKOCITA DECIDUE I PERIFERNE KRVI TRUDNICA**

Identifikaciju leukocitnih subpopulacija u perifernoj krvi trudnica i decidualnoj limfocitnoj suspenziji izvršili smo pomoću protočne citometrije (engl. flow cytometry) nakon 18 satne kultivacije stanica i odvajanja adherentne (decidualni makrofagi) od neadherentne frakcije (decidualni limfociti). Analiza je izvršena na FACScan protočnom citometru (Becton Dickinson) opremljenom organskim laserom. Laserska svjetlost valne duljine 488 nm omogućuje otkrivanje relativne veličine i unutrašnje složenosti stanica

te potiče emisiju svjetla druge valne duljine u fluorokromu koji se nalazi na obilježenoj stanici. U pokusima smo koristili tri fluorokroma: fluorescein izotiocijanat (FITC) koji emitira zelenu svjetlost (500 - 550 nm), fikoeritin (PE) koji emitira narančastu svjetlost (540 - 590 nm) i propidij jodid koji emitira crvenu svjetlost (600 - 650 nm). Propidij jodid selektivno ulazi u mrtve stanice koje onda fluoresciraju crveno pa smo ga koristili za obilježavanje mrtvih stanica. Uzimanje i analiza živih stanica vršena je pomoću FACScan programa (Facscan research software, Becton Dickinson), a grafičko prikazivanje pomoću C30 programa (Consort 30 software, Becton Dickinson). Za analizu smo koristili između 10000 i 20000 živih stanica neadherentne frakcije decidualnih leukocita i limfocita periferne krvi, a dobivene podatke pohranjivali smo na magnetski medij.

Postupak pripreme stanica za protočnu citometriju izveli smo na ledu u plastičnim epruvetama s okruglim dnom ili eppendorf kontejnerima od 1,5 ml. Pripremljena suspenzija neadherentnih leukocita iz decidualnog tkiva nakon 18 satne kulture (engl. overnight culture) i limfocita periferne krvi iste trudnice resuspendirana je i isprana u hladnom FACS mediju. Sve inkubacije smo izveli u ukupnom volumenu od 0,2 ml. Ispiranja smo vršili s 1 ml hladnog FACS medija. Način obilježavanja stanica ovisio je o vrsti monoklonskih antitijela i o svrsi obilježavanja stanica.

Primarna monoklonska antitijela koja specifično reagiraju s humanim staničnim antigenima i kojima smo se koristili u studiji, originalni su proizvodi tvrtke Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Monoclonal Center, Mountain View, California. Vrste spomenutih monoklonskih antitijela, njihovu specifičnost prema antigenima kao i distribuciju antigena u ljudskom organizmu prikazali smo u Tablici 2 (iz Monoclonal Antibody Source Book - Becton Dickinson, Revised Version, May 1988).

U radu smo se koristili indirektnom metodom bojenja koja zahtijeva dvostruko više vremena, ali joj je temeljna prednost u odnosu na direktnu imunofluorescenciju što povećava osjetljivost testa i tako omogućuje

TABLICA 2. MONOKLONSKA ANTITIJELA, SPECIFIČNI STANIČNI ANTIGENI I  
DISTRIBUCIJA ANTIGENA U LJUDSKOM ORGANIZMU

MONOKLONSKA ANTITIJELA *	SPECIFIČNI ANTIGENI	DISTRIBUCIJA	ANTIGENA
ANTI-LEUCOCYTE	CD45	svi leukociti, >95% limfocita, monocita, polimorfonukleara	
ANTI-LEU-5b	CD2	limfociti periferne krvi (E-rosete), subpopulacija NK stanica	
ANTI-LEU-4	CD3	zreli T-limfociti periferne krvi	
ANTI-LEU-3a ANTI-LEU-3b	CD4	pomažički/indukcijski T-limfociti, monociti, makrofagi	
ANTI-LEU-2a	CD8	citotoksični/supresijski T-limfociti, neke Leu-11+ NK stanice, neke Leu-15+ supresijske i Leu-7+ stanice bez NK aktivnosti	
ANTI-LEU-M5	CD11-c	monociti, granulociti, veliki granulirani limfociti	
ANTI-LEU-M3	CD14	zreli monociti periferne krvi	
ANTI-LEU-M1	CD15	zreli granulociti i monociti periferne krvi	
ANTI-LEU-11a	CD16	NK stanice i neutrofili	
ANTI-LEU-14	CD22	B-limfociti periferne krvi i limfoidnog tkiva	
ANTI-HLA-DR	HLA-DR	monociti/makrofagi, aktivirane T-stanice, oko 11% limfocita periferne krvi	

\* tvrtka BECTON DICKINSON

otkrivanje antigena čija je gustoća na površini stanica vrlo mala. Indirektna imunofluorescencija izvodi se u dvije faze od kojih je prva identična onoj u metodi direktne imunofluorescencije. Razlika je u kvaliteti antitijela prve faze: kod indirektna metode primarna antitijela nisu konjugirana s biotinom. U drugoj fazi, nakon ispiranja nevezanih antitijela, stanice obilježene primarnim antitijelima pomiješaju se sa sekundarnim reagensima i inkubiraju na ledu kroz 30 - 45 minuta. Reagensi druge faze su antitijela protiv primarnih antitijela konjugirana s fluorescentnom bojom (sekundarna antitijela) ili avidin konjugiran s fluorokromom. Sekundarne reagense dodavali smo u koncentraciji od 1 - 2  $\mu\text{g}$  po probi. Nakon inkubacije, nevezane sekundarne reagense u suvišku ispirali smo s 1 ml hladnog FACS medija (dva puta) i resuspendirali u istom volumenu medija s 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  propidij jodida.

## **2.9. DOBIVANJE LIMFOCITA IZ PERIFERNE KRVI TRUDNICE**

Prije zahvata, odnosno uvođenja u opću intravensku i inhalacijsku anesteziju, ženi smo pomoću heparinirane brizgalice izvadili 15 - 20 ml krvi iz kubitalne vene. Centrifugiranjem na gradijentu (Hypaque- Ficoll) pri 800x g izdvojili smo limfocite periferne krvi. Limfocite smo zatim dvaput isprali u RPMI 1640 mediju, izbrojili i njihov broj prilagodili potrebama pokusa.

## **2.10. TEST BLASTIČNE TRANSFORMACIJE**

U testovima blastične transformacije koji su rađeni na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci, limfocite periferne krvi trudnice upotrijebili smo kao stanice respondere, a singeničke decidualne limfocite i makrofage kao imunoregulacijske stanice. Stanice smo nakon odvajanja iz periferne krvi odnosno decidualnog tkiva kultivirali u mikrotitar pločama s 96 jamica s ravnim dnom (Grainer FRG) na 37°C uz apsolutnu vlažnost i 5% ugljičnog dioksida. Ukupni volumen po jednoj jamici iznosio je 250 mikrolitara. Pritom smo humani AB krvni serum, limfocite periferne krvi



trudnice ( $1 \times 10^5$  stanica / 50 mikrolitara medija), mitogen i decidualne limfocite/makrofage ( $1 \times 10^5$  stanica / 50 mikrolitara medija) stavljali u jednakim volumenima od 50 mikrolitara po jamici. Da bi postigli ukupni volumen od 250 mikrolitara po jamici, dodavali smo potrebnu količinu medija. Od mitogena koristili smo se fitohemaglutininom (PHA) i konkanavalinom A (Con-A). Prethodno opisanu suspenziju stanica u jamici inkubirali smo kroz 72 sata, a zatim smo joj dodavali 50 mikrolitara medija s  $^3\text{H}$  timidinom (Amersham, England). Slijedila je kultivacija kroz 18 sati, a onda smo sve uzorke precipitirali na mikrotitar papir, dodali im scintilacijsku tekućinu i izmjerili radioaktivnost u beta brojaču.

Sve smo kulture radili u triplicatu ili kvadruplicatu. Rezultate smo izrazili kao srednju vrijednost otkucaja u minuti (engl. counts per minute - cpm) s pogreškom aritmetičke sredine, indeksom stimulacije i postotkom supresije.

## 2.11. REAKCIJA POMIJEŠANIH LIMFOCITA

Za potrebe spomenute pretrage (engl. mixed lymphocyte reaction - MLR) mitoze limfocita nepoznate ili treće osobe koje smo upotrijebili kao stimulatorske stanice, zakočili smo pomoću mitomicina C, pri čemu se njihova antigenost nije mijenjala. Stimulatorske stanice smo nakon brojanja stavljali u jamice u količini od  $2 \times 10^5$  stanica (odnosno  $2 \times 10^6$  stanica/ml). Limfociti periferne krvi trudnice u koncentraciji od  $1 \times 10^5$  stanica po jamici odnosno  $2 \times 10^6$  stanica/ml služili su nam kao stanice responderi. Decidualne limfocite iste trudnice dodavali smo u reakciji pomiješanih limfocita kao imunoregulacijske stanice u različitim koncentracijama. Ukapavanje u jamice obavljali smo na pločama za mikrokulturu ( $1 \times 10^5$  stanica/jamici). Ukupni volumen po jamici iznosio je ponovno 250 mikrolitara. Od te količine, na svaki je sastojak (AB serum, stanice responderi, stanice stimulatori, imunoregulacijske stanice i medij) otpadalo po 50 mikrolitara. U kontrolnim skupinama s manje volumnih dijelova, ukupni volumen od 250 mikrolitara po jamici nadopunili smo dodatkom medija.

U reakciji pomiješanih limfocita dodavali smo nakon petodnevne kulture po 50 mikrolitara medija označenog s  $^3\text{H}$  timidinom. Nakon 18 sati uzorke smo precipitirali na mikrotitar papir, a radioaktivnost izmjerili u scintilacijskom brojaču. Kulture smo radili u triplikatu ili kvadriplikatu, a rezultate smo izrazili kao srednju vrijednost otkucaja u minuti s pogreškom aritmetičke sredine te pomoću postotka supresije.

## 2.12. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statističku obradu podataka izvršili smo pomoću Studentovog testa i  $\chi^2$  - testa, a u radu smo se koristili standardnim kompjutorskim programom STATGRAPHICS software (Statistical Graphics Corporation, 1986). Rezultate smo izrazili u obliku srednje vrijednosti broja otkucaja u minuti (cpm) s pogreškom aritmetičke sredine, te pomoću indeksa stimulacije i postotka supresije (S).

Formula za izračunavanje indeksa stimulacije (IS):

$$\text{IS} = \text{ispitivani uzorak (cpm)} / \text{kontrolni uzorak (cpm)}$$

Formula za izračunavanje postotka supresije (S):

$$\text{S} = ((\text{očekivani broj (cpm)} - \text{dobiveni broj (cpm)}) / \text{očekivani broj (cpm)}) \times 100$$

### 3. REZULTATI

#### 3.1. CITOGENETSKA ANALIZA

Trofoblast i dijelove embrija iz patoloških trudnoća missed abortion i blighted ovum analizirali smo s obzirom na kromosomski sastav njihovih stanica.

Citogenetska analiza stanica pobačenih plodova nije nam uspjela u 19 slučajeva zbog izraženih nekrotičnih promjena u tkivima koja smo imali na raspolaganju za analizu. Tada se najčešće radilo o patološkim trudnoćama iz skupine missed abortion.

U 34 slučaja citogenetska analiza bila je uspješna a rezultati su bili sljedeći: kromosomska aberacija utvrđena je u 12 slučajeva (35%) spontano pobačenih plodova. Pritom su najčešće ustanovljene **trisomije** (sedam slučajeva) i **triploidije** (četiri slučaja) te jedan slučaj **tetraploidije**. U preostala 22 slučaja spontano pobačenih plodova utvrđen je normalan kariotip s prevalencijom ženskog (46,XX) u odnosu na muški (46,XY) kariotip (2,7:1).

Od navedenih 12 slučajeva patoloških citogenetskih nalaza, devet ih je pripadalo patološkim trudnoćama iz skupine blighted ovum, što je činilo 60% od ukupnog broja slučajeva spomenute vrste patološke trudnoće (n = 15). U skupini patoloških trudnoća missed abortion (n = 19) bila su tri patološka nalaza kariotipa što čini 16% od ukupnog broja ispitivanih slučajeva missed abortion u studiji. U sva tri slučaja radilo se o triploidiji 69,XXY.

#### 3.2. IMUNOHISTOLOGIJA

Tehnikom indirektno imunoperoksidaze ispitali smo imunohistološke karakteristike humane decidue prvog tromjesečja u normalnim trudnoćama, trudnoćama blighted ovum i trudnoćama missed abortion i prikazali ih u Tablici 3 i Tablici 4.

TABLICA 3. ZASTUPLJENOST POVRŠINSKIH ANTIGENA NA LEUKOCITIMA U HUMANOJ DECIDUI NORMALNIH TRUDNOĆA PRVOG TROMJESEČJA ODREĐENA POMOĆU IMUNOHISTOLOGIJE

ANTIGENA SPECIFIČNOST	BAZALNA DECIDUA $X_{\bar{g}} \pm S_x^*$	PARIJETALNA DECIDUA $X_{\bar{g}} \pm S_x^*$
CD2	18,1 $\pm$ 1,9	18,0 $\pm$ 2,3
CD3	1,4 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,9
CD4	19,6 $\pm$ 2,4	19,3 $\pm$ 6,9
CD8	15,5 $\pm$ 2,7	19,0 $\pm$ 3,3
NKH-1	25,3 $\pm$ 1,9	27,1 $\pm$ 1,8
MAKROFAGI	+++	+++
CD21	+/-	+/-
gamma/delta TCR	+/-	+/-

$X_{\bar{g}} \pm S_x$  srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška pozitivnih stanica u jednom od 15 vidnih polja (317 X)

+++ više od 40 stanica u jednom vidnom polju

+/- brojčano oskudne stanice

\* ne postoji statistički značajna razlika niti u jednom od parova rezultata

TABLICA 4. ZASTUPLJENOST POVRŠINSKIH ANTIGENA NA LEUKOCITIMA HUMANE BAZALNE DECIDUE U SKUPINI NORMALNIH TRUDNOĆA, TRUDNOĆA BLIGHTED OVUM I MISSED ABORTION PRVOG TROMJESEČJA

ANTIGEN	NORMALNA TRUDNOĆA $\bar{x}_g \pm s_x$	BLIGHTED OVUM $\bar{x}_g \pm s_x$	MISSED ABORTION $\bar{x}_g \pm s_x$
CD2	18,1 ± 1,9	13,7 ± 2,2	15,2 ± 3,8
CD3	1,4 ± 0,4	1,5 ± 0,5	6,0 ± 1,3
CD4	19,6 ± 2,4	13,2 ± 2,0	19,0 ± 2,6
CD8	15,5 ± 2,7	4,5 ± 1,2	11,0 ± 1,7
NKH-1	25,3 ± 1,9	26,6 ± 3,3	34,4 ± 4,1
MAKROFAGNI	+++	+++	+++

$\bar{x}_g \pm s_x$  srednja vrijednost ± standardna pogreška pozitivnih stanica u jednom od 15 vidnih polja (317x)

+++ više od 40 stanica u vidnom polju

Određujući pomoću monoklonskih antitijela (Tablica 1) zastupljenost CD2+, CD3+, CD4+, CD8+, NKH-1+, CD21+, gamma/delta TCR+ stanica te makrofaga u tkivima bazalne i parijetalne decidue nismo uočili bitnije razlike. U Tablici 3. prikazali smo zastupljenost površinskih antigena na decidualnim leukocitima u tkivu bazalne i parijetalne decidue u jednom od uzoraka normalne trudnoće prvog tromjesečja.

Dominantne stanice među decidualnim leukocitima u sve tri vrste ispitivanih trudnoća prvog tromjesečja bile su stanice s antigenskim obilježjem makrofaga. Budući da se u odnosu na sve ostale subpopulacije decidualnih limfocita radilo o vrlo velikom broju prisutnih decidualnih makrofaga, nismo ih pojedinačno brojili, već smo ih u rezultatima prikazali kao masu stanica (Tablica 4). Utisak je bio da su makrofagi bili više raspoređeni oko decidualnih krvnih kapilara/arteriola.

Slijedeća po zastupljenosti stanična subpopulacija decidualnih limfocita bile su NKH-1+ (CD56+) stanice. Prosječan broj spomenutih decidualnih stanica bio je podjednako velik u normalnim i ispitanim patološkim trudnoćama (Tablica 4). Iako brojčano slabije zastupljene, CD2+ stanice bile su slično raspoređene u decidualnoj stromi poput NKH-1+ stanica što je ukazivalo na vjerojatnost da određeni broj NKH-1+ stanica posjeduje ujedno i CD2 antigen. Također i CD2+ stanice bile su podjednako zastupljene u decidui svih triju vrsta ispitivanih ranih humanih trudnoća.

Zastupljenost CD3 antigena na površini decidualnih stanica bila je relativno malena u odnosu na većinu ostalih površinskih antigena i nije se značajnije razlikovala u bazalnoj u odnosu na parijetalnu deciduu. Isto tako, njihova zastupljenost nije značajnije varirala bez obzira na vrstu ispitivane trudnoće.

Stanice CD4+ nisu pokazivale veća odstupanja u broju u ovisnosti o vrsti rane trudnoće, odnosno o mjestu uzimanja bioptičkog uzorka decidue (bazalna/parijetalna) (Tablica 3, Tablica 4).

U normalnim trudnoćama prvog tromjesečja postotak CD8+ stanica u bazalnoj i parijetalnoj decidui nije se značajnije razlikovao. U odnosu na normalne trudnoće, u nekoliko ispitanih uzoraka decidue trudnoća blighted ovum i missed abortion opazili smo niži postotak CD8+ stanica (Tablica 4). Međutim, zbog malog broja ispitanih slučajeva, zbog velikih bioloških razlika (velike standardne devijacije) i činjenice da se biopsijom ne mora dobiti reprezentativni uzorak decidualnog tkiva, opažene razlike zasad se teško mogu smatrati značajnima.

Zanimljivo je napomenuti da je ukupni postotak CD4 i CD8 površinskih biljega na stanicama decidue svih ispitivanih trudnoća prvog tromjesečja bio nekoliko puta veći od zastupljenosti CD3 antigena na površini decidualnih stanica.

U decidualnoj stromi uspjeli smo pomoću specifičnih monoklonskih antitijela pokazati nepravilno rasporedene i brojčano vrlo slabo zastupljene CD21+ stanice (B limfociti) i gamma/delta TCR+ stanice.

### **3.3. IDENTIFIKACIJA LEUKOCITNIH SUBPOPULACIJA U SUSPENZIJI LEUKOCITA DECIDUE I PERIFERNE KRVI TRUDNICA**

Udio limfocitnih subpopulacija i brojčane odnose među njima odredili smo, kao što je već opisano, pomoću metode protočne citometrije nakon izdvajanja adherentne frakcije stanica iz suspenzije decidualnih leukocita. Rezultate smo izrazili u postocima (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška) i prikazali ih za svaku promatranu skupinu trudnoća zasebno. Da bi dobili realan postotak pozitivnih stanica za svaku od subpopulacija decidualnih limfocita u svakom pojedinačno analiziranom slučaju, oduzimali smo od dobivenog rezultata postotak nespecifično pozitivnih stanica (kontrola), koji u pojedinom slučaju nije smio prelaziti 10% (prosječno je iznosio 4%).

Pomoću iste metode (Facs analize) ispitivali smo i na identičan način prikazali, zastupljenost i odnose između limfocitnih subpopulacija u perifernoj krvi istih trudnica.

Za identifikaciju limfocitnih subpopulacija u suspenziji stanica decidue i periferne krvi koristili smo ukupno jedanaest različitih primarnih monoklonskih antitijela (Tablica 2). Kako decidualno tkivo, pored leukocita koje smo željeli ispitati, sadrži i epitelne stanice, fibroblaste, krvne stanice i druge neleukocitne stanice morali smo se osigurati da u svojim istraživanjima ispitujemo zaista samo leukocitnu frakciju stanica decidue. Koristeći se monoklonskim antitijelom Anti- Leucocyte (Anti-HLe 1) koje se specifično veže na humani panleukocitni antigen HLe-1 ili CD45, obilježili smo stanice u decidualnoj leukocitnoj suspenziji. Pritom smo uvijek u pojedinom uzorku koji smo željeli analizirati, imali najmanje 70% suspendiranih decidualnih leukocita pozitivnih na CD45 antigen, a najčešće između 80% i 90%.

Mrtve stanice koje su selektivno obojene propidij jodidom fluorescirale crveno, nismo uzimali u obzir prilikom analize stanica u protočnom citometru.

### **3.3.1. Periferna krv trudnica**

U nekoliko slučajeva, u svakoj od skupina ispitivanih vrsta trudnoća, iz periferne krvi trudnica od kojih je uzeta decidua, pripravljena je suspenzija limfocita periferne krvi i pripremljena za analizu u protočnom citometru. Rezultate smo prikazali u Tablici 5.

U skupini normalnih trudnoća zastupljenost analiziranih površinskih biljega na membrani limfocita periferne krvi bila je izražena na sljedeći način: stanice s CD2 antigenom bile su najbrojnije, a redom su slijedile CD3+, CD4+, CD8+, HLA-DR+ i CD11-c+ stanice. Od samog udjela pojedinih površinskih staničnih biljega među limfocitima periferne krvi trudnice, važniji su bili njihovi međusobni odnosi. Tako smo opazili da je subpopulacija CD4+ stanica bila značajno više zastupljena od stanica s CD8 (omjer



TABLICA 5. ZASTUPLJENOST POVRŠINSKIH ANTIGENA NA LIMFOCITIMA PERIFERNE KRVI U SKUPINI NORMALNIH (n = 10) I PATOLOŠKIH TRUDNOĆA (n = 5) PRVOG TROMJESEČJA

ANTIGEN	POZITIVNE STANICE $X_s \pm SD(\%)^*$	
	NORMALNA **	PATOLOŠKA**
CD45	88 $\pm$ 11	82 $\pm$ 11
CD2	71 $\pm$ 14	70 $\pm$ 11
CD3	66 $\pm$ 5	57 $\pm$ 11
CD4	41 $\pm$ 7	36 $\pm$ 10
CD8	23 $\pm$ 4	28 $\pm$ 8
CD11-c	8 $\pm$ 5	18 $\pm$ 12
CD14	0	0
CD15	0	2 $\pm$ 3
CD16	5 $\pm$ 0	6 $\pm$ 2
CD22	3 $\pm$ 4	3 $\pm$ 4
HLA-DR	13 $\pm$ 7	18 $\pm$ 8

\* rezultati su korigirani s obzirom na postotak nespecifično pozitivnih stanica (5  $\pm$  1)

\*\* trudnoće

CD4+/CD8+ >1), CD11-c (omjer CD4+/CD11-c+ >1) i HLA-DR površinskim biljgom (omjer CD4+/HLA-DR+ >1) u svim analiziranim slučajevima.

Iako u patološkim trudnoćama prvog tromjesečja, u odnosu na skupinu normalnih trudnoća, nismo opazili statistički značajne razlike u sastavu limfocitnih suspenzija periferne krvi, trebalo bi ipak napomenuti veći udio CD11-c+ stanica u spomenutim limfocitnim suspenzijama u patološkim u odnosu na normalne trudnoće. Omjeri između zastupljenosti CD4 i CD8, CD4 i CD11-c te CD4 i HLA-DR površinskih antigena među limfocitima periferne krvi trudnica s patološkom trudnoćom bili su identični (tj. >1) onima u skupini normalnih trudnoća.

### **3.3.2. Suspenzije decidualnih limfocita**

U suspenzijama decidualnih limfocita svih ispitivanih skupina trudnoća prvog tromjesečja brojčano najslabije bile su zastupljene CD14+, CD15+, CD22+ i CD16+ stanice. Njihov prosječni udio među ostalim analiziranim stanicama nije prelazio 5%.

#### **3.3.2.1. Skupina normalnih trudnoća**

Među analiziranim decidualnim limfocitima njih 58% posjedovalo je CD2 površinski antigen. Sljedeća najbrojnija stanična subpopulacija bile su CD11-c+ stanice (44%). Zrelih T limfocita (CD3+) bilo je prosječno 21%, a stanica koje nose HLA-DR antigenska obilježja oko 14%. Zastupljenost CD8 površinskog antigena, odnosno antigena citotoksičnih i supresijskih T limfocita (prosječno 21%), bila je znatno veća od one CD4 antigena koji je bio prosječno zastupljen sa 6%. Omjer decidualnih limfocita s CD4 i CD8 diferencijacijskim biljgom bio je upravo obrnut u odnosu na omjer spomenutih površinskih antigena u perifernoj krvi trudnica prvog tromjesečja. Rezultate FACS analize prikazali smo u Tablici 6.

TABLICA 6. ZASTUPLJENOST POVRŠINSKIH ANTIGENA U SUSPENZIJI LIMFOCITA DECIDUE U SKUPINI NORMALNIH TRUDNOĆA (n = 6) I NJIHOV ODNOS PREMA ZASTUPLJENOSTI POVRŠINSKIH ANTIGENA U SUSPENZIJAMA DECIDUALNIH LIMFOCITA TRIJU VRSTA PATOLOŠKIH TRUDNOĆA PRVOG TROMJESEČJA

VRSTA ANTIGENA	NORMALNA TRUDNOĆA $\bar{X}_S \pm SD(\%)^*$	BLIGHTED OVUM $\bar{X}_S \pm SD(\%)^*$	MISSED ABORTION $\bar{X}_S \pm SD(\%)^*$	IZVANMATERNIČNA TRUDNOĆA $\bar{X}_S \pm SD(\%)^*$
CD45	83 ± 16	88 ± 11	85 ± 9	74 ± 16
CD2	58 ± 14	67 ± 12	61 ± 11	53 ± 8
CD3	21 ± 11	19 ± 11	25 ± 11	29 ± 9
CD4	6 ± 2	9 ± 7	11 ± 5	15 ± 3 <sup>***</sup>
CD8	21 ± 13	18 ± 4	22 ± 11	18 ± 6
CD11-C	44 ± 23	48 ± 17	40 ± 13	24 ± 14
CD14	0	1 ± 1	2 ± 2	2 ± 4
CD15	3 ± 2	3 ± 2	2 ± 2	3 ± 4
CD16	3 ± 1	3 ± 2	5 ± 4	/
CD22	1 ± 0	2 ± 2	/	0
HLA-DR	14 ± 5	20 ± 4 <sup>**</sup>	16 ± 3	7 ± 1

$\bar{X}_S \pm SD(\%)$  srednja vrijednost ± standardna devijacija

\* rezultati su korigirani s obzirom na postotak nespecifično pozitivnih stanica (4 ± 2)

\*\* razina statističke značajnosti; p < 0,05

\*\*\* razina statističke značajnosti; p < 0,005

Zanimljivi su bili i odnosi između udjela pojedinih diferencijacijskih membranskih biljega na suspendiranim decidualnim limfocitima. U decidui normalnih trudnoća CD11-c površinski biljeg bio je zastupljen više od CD3, CD4 i CD8 biljega, ali je razlika bila statistički značajna jedino u odnosu na CD4 površinski biljeg ( $t=4,01$   $p < 0,005$ ), pa je tako, u odnosu na perifernu krv trudnica, omjer spomenutih biljega također doživio potpunu inverziju ( $CD4+/CD11-c+ < 1$ ). HLA antigen klase II bio je statistički značajnije zastupljen od CD4 površinskog antigena ( $t=3,02$   $p < 0,05$ ).

Zastupljenost CD3 i CD4 površinskih antigena na membrani suspendiranih decidualnih limfocita bila je znatno smanjena u odnosu na zastupljenost spomenutih antigena na limfocitima periferne krvi trudnica. CD11-c površinski biljeg našli smo, međutim, u značajno višem postotku među suspendiranim decidualnim limfocitima nego na površini limfocita periferne krvi trudnica.

### **3.3.2.2. Skupine patoloških trudnoća**

U Tablici 6. prikazali smo zastupljenost pojedinih staničnih biljega na površini suspendiranih decidualnih limfocita u skupinama trudnoća blighted ovum i missed abortion i skupini izvanmaterničnih trudnoća i usporedili je s postotkom odgovarajućih površinskih biljega u suspenziji decidualnih limfocita iz decidue normalnih trudnoća.

U skupinama trudnoća blighted ovum i missed abortion nismo opazili značajnije razlike u zastupljenosti pojedinih površinskih antigena na decidualnim limfocitima u odnosu na odgovarajuće antigene na površini suspendiranih decidualnih limfocita u skupini normalnih trudnoća. Tako su i omjeri površinskih staničnih antigena CD4/CD8, CD4/CD11-c te CD4/HLA-DR bili identični onima u skupini normalnih trudnoća, tj. bili su manji od jedinice.

TABLICA 7. ZASTUPLJENOST POVRŠINSKIH ANTIGENA U SUSPENZIJI LIMFOCITA DECIDUE U SKUPINI IZVANMATERNIČNIH TRUDNOĆA (n = 5) I NJIHOV ODNOS PREMA ZASTUPLJENOSTI ANTIGENA NA POVRŠINI SUSPENDIRANIH DECIDUALNIH LIMFOCITA U OSTALIH TRIJU VRSTA ISPITIVANIH TRUDNOĆA PRVOG TROMJESEČJA

VRSTA ANTIGENA	IZVANMATERNIČNA TRUDNOĆA $\bar{x} \pm SD(\%)^*$	NORMALNA TRUDNOĆA (n = 6)	BLIGHTED OVUM (n = 8)	MISSED ABORTION (n = 9)
CD45	74 ± 16	NS	NS	NS
CD2	53 ± 8	NS	p < 0,05**	NS
CD3	29 ± 9	NS	NS	NS
CD4	15 ± 3	p < 0,005***	NS	NS
CD8	18 ± 6	NS	NS	NS
CD11-C	24 ± 14	NS	p < 0,05**	NS
CD14	2 ± 4	NS	NS	NS
CD15	3 ± 4	NS	NS	NS
CD16	/	/	/	/
CD22	0	NS	NS	NS
HLA-DR	7 ± 1	NS	p < 0,001****	p < 0,001****

\* rezultati su korigirani s obzirom na postotak neaspecifično pozitivnih stanica (6 ± 4)

\*\* razina statističke značajnosti; t = 2,27

\*\*\* razina statističke značajnosti; t = 4,86

\*\*\*\* razina statističke značajnosti; t = 6,61

NS nije statistički značajno; n broj slučajeva

Zastupljenost specifičnih površinskih biljega na decidualnim limfocitima u skupini izvanmaterničnih trudnoća doživjela je u odnosu na zastupljenost odgovarajućih biljega među limfocitima periferne krvi trudnica promjene slične onima u skupinama normalnih i patoloških intrauterinih trudnoća. To znači da je u suspenzijama decidualnih limfocita, u odnosu na perifernu krv, došlo do smanjenja postotka stanica s CD4 površinskim antigenom, dok se postotak stanica s CD11-c površinskim biljedom uvećao. Osobitosti koje karakteriziraju skupinu izvanmaterničnih trudnoća su statistički značajno veća zastupljenost CD4+ decidualnih stanica u spomenutoj skupini trudnoća u odnosu na suspenzije decidualnih limfocita u skupini normalnih trudnoća ( $p < 0,05$ ), te značajno niža zastupljenost CD11-c+ ( $p < 0,05$ ) i HLA-DR+ ( $p < 0,001$ ) decidualnih stanica u odnosu na skupinu trudnoća blighted ovum (Tablica 7). Istovremeno, u suspenziji decidualnih limfocita u skupini izvanmaterničnih trudnoća omjer između CD4 i CD8 površinskih biljega približno je jednak jedinici, omjer CD4 i CD11-c biljega manji je od jedinice, dok je omjer CD4/HLA-DR površinskih biljega gotovo identičan onom u perifernoj krvi trudnica.

### **3.4. STIMULACIJA POLIKLONSKIM MITOGENIMA**

Poliklonskim mitogenima - fitohemaglutininom (PHA) i konkanavalinom A (Con-A) stimulirali smo limfocite periferne krvi trudnice i, odvojeno, adherentnu i neadherentnu frakciju leukocita nakon izdvajanja iz suspenzije decidualnih leukocita. Pritom smo promatrali spontanu proliferaciju singeničkih limfocita periferne krvi i spomenutih frakcija decidualnih leukocita kao i njihov odgovor na stimulacijski učinak poliklonskih mitogena. Rezultate smo prikazali po skupinama, za svaku vrstu ispitivane trudnoće posebno.

### **3.4.1. Skupina normalnih trudnoća**

U Tablici 8. prikazali smo učinak stimulacije limfocita periferne krvi trudnice, decidualnih limfocita i decidualnih makrofaga (adherentne stanice) u testu blastične transformacije u skupini normalnih trudnoća. Spontana proliferacija decidualnih limfocita bila je deseterostruko, a adherentnih stanica šesterostruko veća od spontane proliferacije limfocita periferne krvi u iste trudnice. Stimulacija limfocita periferne krvi s PHA (IS=196) i Con-A (IS=72) rezultirala je izrazitom proliferacijom, dok je proliferacija decidualnih limfocita (IS=3,8) i decidualnih adherentnih stanica (IS= 3,7) bila slaba.

### **3.4.2. Skupine patoloških trudnoća**

U skupinama patoloških trudnoća prvog tromjesečja, bez izuzetaka, decidualni limfociti i decidualne adherentne stanice spontano su proliferirali jače od singeničkih limfocita periferne krvi.

U skupini trudnoća blighted ovum spontana proliferacija decidualnih limfocita (neadherentna frakcija stanica) bila je u prosjeku četiri puta veća, a decidualnih makrofaga (adherentna frakcija) trostruko veća od spontane proliferacije singeničkih limfocita periferne krvi. Prosječne vrijednosti spontane aktivnosti decidualnih limfocita i makrofaga, prikazane pomoću broja otkucaja u minuti (cpm), pregledno su date u Tablici 9. U istoj tablici prikazali smo i proliferacijski odgovor decidualnih limfocita i makrofaga i limfocita periferne krvi istih trudnica izražen pomoću broja otkucaja u minuti i indeksa stimulacije (IS). Poliklonski mitogen PHA, u odnosu na Con-A, snažnije je stimulirao proliferaciju i decidualnih leukocita i singeničkih limfocita periferne krvi. Decidualni limfociti i adherentne stanice pokazivali su statistički znatno slabiji proliferacijski odgovor u odnosu na singeničke limfocite periferne krvi ( $p < 0,001$ ), bez obzira na vrstu primijenjenog poliklonskog mitogena. Decidualni limfociti stimulirani s PHA i Con-A proliferirali su u apsolutnom broju jače od adherentnih stanica, ali zbog veće spontane proliferacije

TABLICA 8. STIMULACIJA LIMFOCITA PERIFERNE KRVI, DECIDUALNIH LIMFOCITA I ADHERENTNIH STANICA DECIDUE POMOĆU POLIKLONSKIH MITOGENA U SKUPINI NORMALNIH TRUDNOĆA (n = 8)

	SPONTANA PROLIFERACIJA STANICA $X_S \pm S_X$	STIMULIRANA PROLIFERACIJA STANICA	
		PHA $X_S \pm S_X$	Con-A $X_S \pm S_X$
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK)*	621 $\pm$ 21	121262 $\pm$ 4088	44073 $\pm$ 3532
Indeks stimulacije		196,0	72
DECIDUALNI LIMFOCITI (DL)*	6672 $\pm$ 52	24820 $\pm$ 3439	11103 $\pm$ 1519
Indeks stimulacije		3,8	1,8
ADHERENTNE STANICE (AS)*	3605 $\pm$ 136	12997 $\pm$ 418	13908 $\pm$ 1001
Indeks stimulacije		3,7	3,8

\*  $1 \times 10^6$  stanica/50 mikrolitara medija

PHA - poliklonski mitogen fitohemaglutinin

Con-A - poliklonski mitogen konkanavallin A

$X_S \pm S_X$  - otkucaji u minuti (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška)



TABLICA 9. STIMULACIJA LIMFOCITA PERIFERNE KRVI, DECIDUALNIH LIMFOCITA I ADHERENTNIH STANICA DECIDUE POMOĆU POLIKLONSKIH MITOGENA U SKUPINI TRUDNOĆA BLIGHTED OVUM (n = 8)

	SPONTANA PROLIFERACIJA STANICA $X_S \pm S_X$	STIMULIRANA PROLIFERACIJA STANICA	
		PHA $X_S \pm S_X$	Con-A $X_S \pm S_X$
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	1285 $\pm$ 478	104203 $\pm$ 10370	30910 $\pm$ 8835
Indeks stimulacije		81,1	24,0
DECIDUALNI LIMFOCITI (DL) *	4645 $\pm$ 2359	27543 $\pm$ 13032	10277 $\pm$ 7216
Indeks stimulacije		5,9	2,2
ADHERENTNE STANICE (AS) *	3877 $\pm$ 2011	15514 $\pm$ 11890	3976 $\pm$ 1297
Indeks stimulacije		4,0	1,0

\*  $1 \times 10^5$  stanica/50 mikrolitara medija

PHA - poliklonski mitogen fitohemaglutinin

Con-A - poliklonski mitogen konkanavalin A

$X_S \pm S_X$  - otkucaji u minuti (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška)

TABLICA 10. STIMULACIJA LIMFOCITA PERIFERNE KRVI, DECIDUALNIH LIMFOCITA I ADHERENTNIH STANICA DECIDUE POMOĆU POLIKLONSKIH MITOGENA U SKUPINI TRUDNOĆA MISSED ABORTION (n = 9)

	SPONTANA PROLIFERACIJA STANICA  $X_S \pm S_X$	STIMULIRANA PROLIFERACIJA STANICA	
		PHA $X_S \pm S_X$	Con - A $X_S \pm S_X$
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	1115 $\pm$ 409	83686 $\pm$ 13682	42057 $\pm$ 13401
Indeks stimulacije		75,1	37,7
DECIDUALNI LIMFOCITI (DL) *	1351 $\pm$ 346	16979 $\pm$ 4031	3710 $\pm$ 854
Indeks stimulacije		12,6	2,7
ADHERENTNE STANICE (AS) *	1683 $\pm$ 409	4431 $\pm$ 969	3159 $\pm$ 685
Indeks stimulacije		2,6	1,8

\*  $1 \times 10^6$  stanica/50 mikrolitara medija

PHA - poliklonski mitogen fitohemaglutinin

Con-A - poliklonski mitogen konkanavalin A

$X_S \pm S_X$  - otkucaji u minuti (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška)

TABLICA 11. STIMULACIJA LIMFOCITA PERIFERNE KRVI, DECIDUALNIH LIMFOCITA I ADHERENTNIH STANICA DECIDUE POMOĆU POLIKLONSKIH MITOGENA U SKUPINI IZVANMATERNIČNIH TRUDNOĆA (n = 4)

	SPONTANA PROLIFERACIJA STANICA  $X_S \pm S_X$	STIMULIRANA PROLIFERACIJA STANICA	
		PHA $X_S \pm S_X$	Con-A $X_S \pm S_X$
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	819 $\pm$ 517	110054 $\pm$ 16293	25707 $\pm$ 7892
Indeks stimulacije		134,4	31,4
DECIDUALNI LIMFOCITI (DL) *	2158 $\pm$ 509	11976 $\pm$ 7763	2454 $\pm$ 1528
Indeks stimulacije		5,5	1,2
ADHERENTNE STANICE (AS) *	1454 $\pm$ 661	3501 $\pm$ 1897	2003 $\pm$ 1453
Indeks stimulacije		2,4	1,4

\*  $1 \times 10^5$  stanica/50 mikrolitara medija

PHA - poliklonski mitogen fitohemaglutinin

Con-A - poliklonski mitogen konkanavalin A

$X_S \pm S_X$  - otkucaji u minuti (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška)

TABLICA 12. STIMULACIJA LIMFOCITA PERIFERNE KRVI, DECIDUALNIH LIMFOCITA I ADHERENTNIH STANICA DECIDUE POMOĆU POLIKLONSKIH MITOGENA U SKUPINI PONAVLJANIH SPONTANIH POBAČAJA (n = 3)

	SPONTANA PROLIFERACIJA STANICA  $X_S \pm S_X$	STIMULIRANA PROLIFERACIJA STANICA	
		PHA $X_S \pm S_X$	Con-A $X_S \pm S_X$
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	2450 $\pm$ 921	90041 $\pm$ 23225	34365 $\pm$ 26903
Indeks stimulacije		36,8	14,0
DECIDUALNI LIMFOCITI (DL) *	5758 $\pm$ 3433	6767 $\pm$ 2709	2040 $\pm$ 358
Indeks stimulacije		1,2	0,4
ADHERENTNE STANICE (AS) *	4105 $\pm$ 1539	5618 $\pm$ 1740	4908 $\pm$ 1614
Indeks stimulacije		1,4	1,2

\*  $1 \times 10^5$  stanica/50 mikrolitara medija

PHA - poliklonski mitogen fitohemaglutinin

Con-A - poliklonski mitogen konkanavalin A

$X_S \pm S_X$  - otkucaji u minuti (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška)

decidualnih limfocita indeksi stimulacije adherentne i neadherentne frakcije decidualnih leukocita nisu se statistički značajno razlikovali.

U skupini trudnoća missed abortion prvog tromjesečja spontana proliferacija decidualnih limfocita i decidualnih adherentnih stanica bila je tek neznatno veća od spontane proliferacije singeničkih limfocita periferne krvi, pri čemu su decidualne adherentne stanice proliferirale nešto jače od decidualnih limfocita (Tablica 10). U spomenutoj skupini trudnoća, kao i u svim ostalim ispitivanim vrstama ranih trudnoća, poliklonski mitogen PHA imao je, u odnosu na Con-A, znatno jači stimulacijski učinak na kulture decidualnih leukocita i limfocita periferne krvi trudnica. Pritom je stimulirani proliferacijski odgovor limfocita periferne krvi trudnice u odnosu na decidualne limfocite i, osobito, adherentne decidualne stanice ponovno bio najsnažniji. Gotovo identične funkcionalne karakteristike decidualnih limfocita, decidualnih adherentnih stanica i limfocita periferne krvi trudnice u kulturi, prije i nakon stimulacije poliklonskim mitogenima, opazili smo i u skupinama izvanmaterničnih trudnoća (Tablica 11) i skupini ponavljanih spontanih pobačaja (Tablica 12).

### **3.5. IMUNOSUPRESIJSKI UČINAK DECIDUALNIH LEUKOCITA**

Imunoregulacijske sposobnosti decidualnih leukocita ispitali smo u testovima blastične transformacije i u reakcijama pomiješanih limfocita nakon izdvajanja adherentne (decidualni makrofagi) i neadherentne frakcije (decidualni limfociti) stanica iz suspenzije decidualnih leukocita. Rezultate smo prikazali prema vrsti patološke trudnoća, a usporedili smo ih s rezultatima dobivenim prilikom funkcionalnih imunoloških ispitivanja decidualnih leukocita u normalnim trudnoćama prvog tromjesečja.

U testu blastične transformacije, limfocitima periferne krvi trudnice (stanice responderi) stimuliranim s poliklonskim mitogenima PHA i Con-A dodavali smo kao imunoregulacijske stanice, odvojeno, singeničke decidualne limfocite i decidualne adherentne stanice u omjeru responderskih

i imunoregulacijskih stanica 1:1. U prethodnim istraživanjima na normalnim trudnoćama opazili smo, naime, najveći imunosupresijski učinak decidualnih leukocita upravo u navedenom omjeru stanica (neobjavljeni podaci).

U reakciji pomiješanih limfocita, singeničke limfocite periferne krvi kao responderske stanice stimulirali smo limfocitima treće osobe koje smo prethodno zakočili mitomicinom C. U kulturu pomiješanih limfocita dodavali smo kao imunoregulatory singeničke decidualne limfocite u različitim koncentracijama. Testiranje smo proveli u petodnevnoj kulturi.

### **3.5.1. Skupina normalnih trudnoća**

Rezultate testova blastične transformacije prikazali smo u Tablici 13.

Spontana proliferacija limfocita periferne krvi trudnice i decidualnih limfocita u kulturi, izražena brojem otkucaja u minuti (cpm), bila je identična očekivanoj (zbrog vrijednosti proliferacije limfocita periferne krvi i decidualnih limfocita). U kulturi decidualnih adherentnih stanica i singeničkih limfocita periferne krvi zabilježili smo ukupnu spontanu proliferaciju 38% veću od očekivane.

Decidualni limfociti izazvali su u kulturi singeničkih limfocita periferne krvi stimuliranih s PHA supresijski učinak od 39%. Imunosupresiju smo opazili u svim ispitivanim uzorcima. Decidualne adherentne stanice koje smo dodali u kulturu limfocita periferne krvi stimuliranu s PHA proizvele su neznatno veći imunosupresijski učinak (42%). U kulturama singeničkih limfocita periferne krvi koje smo stimulirali s poliklonskim mitogenom Con-A, ni decidualni limfociti ni decidualni makrofagi nisu pokazivali imunosupresijsku aktivnost.

### **3.5.2. Skupine patoloških trudnoća**

U skupini trudnoća blighted ovum imunosupresijski učinak adherentne (makrofagi) i neadherentne (limfociti) frakcije decidualnih leukocita na

TABLICA 13. IMUNOSUPRESIJSKI UČINAK DECIDUALNIH LIMFOCITA I ADHERENTNIH STANICA DECIDUE U TESTU BLASTIČNE TRANSFORMACIJE U SKUPINI NORMALNIH TRUDNOĆA (n = 8)

	SPONTANA PROLIFERACIJA STANICA		STIMULIRANA PROLIFERACIJA STANICA			
	$X_S \pm S_X$		PHA $X_S \pm S_X$		Con-A $X_S \pm S_X$	
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	621	$\pm 21$	121262	$\pm 4088$	44073	$\pm 3532$
DECIDUALNI LIMFOCITI (DL) *	6672	$\pm 52$	24820	$\pm 3439$	11103	$\pm 1519$
ADHERENTNE STANICE (AS) *	3605	$\pm 136$	12997	$\pm 418$	13908	$\pm 1001$
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	7153	$\pm 958$	95939	$\pm 4881$	68636	$\pm 3735$
DECIDUALNI LIMFOCITI (DL) *						
Supresija (%)	/		39	$\pm 14$	/	
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	6739	$\pm 336$	81735	$\pm 1939$	69935	$\pm 3031$
ADHERENTNE STANICE (AS) *						
Supresija (%)	/		42	$\pm 8$	/	

PHA - poliklonski mitogen fitohemaglutinin

Con-A - poliklonski mitogen konkanavalin A

$X_S \pm S_X$  - otkucaji u minuti (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška)

\*  $1 \times 10^5$  stanica/50 mikrolitara medija

TABLICA 14. IMUNOSUPRESIJSKI UČINAK DECIDUALNIH LIMFOCITA I ADHERENTNIH STANICA DECIDUE U TESTU BLASTIČNE TRANSFORMACIJE U SKUPINI TRUDNOĆA BLIGHTED OVUM (n = 8)

	SPONTANA PROLIFERACIJA STANICA		STIMULIRANA PROLIFERACIJA STANICA			
	$X_S \pm S_X$		PHA $X_S \pm S_X$		Con-A $X_S \pm S_X$	
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	1285 ± 478		104203 ± 10370		30910 ± 8835	
DECIDUALNI LIMFOCITI (DL) *	4645 ± 2359		27543 ± 13032		10277 ± 7216	
ADHERENTNE STANICE (AS) *	3877 ± 2011		15514 ± 11890		3976 ± 1297	
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	5806 ± 3068		87956 ± 12215		34861 ± 15003	
DECIDUALNI LIMFOCITI (DL) *						
Supresija (%)	/		32 ± 8		42 ± 9**	
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	6838 ± 3329		80744 ± 14004		28321 ± 10465	
ADHERENTNE STANICE (AS) *						
Supresija (%)	/		43 ± 9**		45 ± 9**	

PHA - poliklonski mitogen fitohemaglutinin

Con-A - poliklonski mitogen konkanavalin A

$X_S \pm S_X$  - otkucaji u minuti (srednja vrijednost ± standardna pogreška)

\*  $1 \times 10^5$  stanica/50 mikrolitara medija

\*\* u 6 uzoraka sa supresijskim učinkom



TABLICA 15. IMUNOSUPRESIJSKI UČINAK DECIDUALNIH LIMFOCITA I ADHERENTNIH STANICA DECIDUE U TESTU BLASTIČNE TRANSFORMACIJE U SKUPINI TRUDNOĆA MISSED ABORTION (n = 9)

	SPONTANA PROLIFERACIJA STANICA		STIMULIRANA PROLIFERACIJA STANICA			
	$X_S \pm S_X$		PHA $X_S \pm S_X$		Con-A $X_S \pm S_X$	
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	1115	± 409	83686	± 13682	42057	± 13401
DECIDUALNI LIMFOCITI (DL) *	1351	± 346	16979	± 4031	3710	± 854
ADHERENTNE STANICE (AS) *	1683	± 409	4431	± 969	3159	± 685
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	3633	± 921	111416	± 16467	51339	± 11607
DECIDUALNI LIMFOCITI (DL) *						
Supresija (%)	/		/		/	
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	3395	± 1121	110056	± 11429	64956	± 19228
ADHERENTNE STANICE (AS) *						
Supresija (%)	/		/		/	

PHA - poliklonski mitogen fitohemaglutinin

Con-A - poliklonski mitogen konkanavalin A

$X_S \pm S_X$  - otkucaji u minuti (srednja vrijednost ± standardna pogreška)

\*  $1 \times 10^5$  stanica/50 mikrolitara medija

TABLICA 16. IMUNOSUPRESIJSKI UČINAK DECIDUALNIH LIMFOCITA I ADHERENTNIH STANICA DECIDUE U TESTU BLASTIČNE TRANSFORMACIJE U SKUPINI IZVANMATERNIČNIH TRUDNOĆA (n = 4)

	SPONTANA PROLIFERACIJA STANICA		STIMULIRANA PROLIFERACIJA STANICA			
	$X_S \pm S_X$		PHA $X_S \pm S_X$		Con-A $X_S \pm S_X$	
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	819	$\pm$ 517	110054	$\pm$ 16293	25707	$\pm$ 7892
DECIDUALNI LIMFOCITI (DL) *	2158	$\pm$ 509	11976	$\pm$ 7763	2454	$\pm$ 1528
ADHERENTNE STANICE (AS) *	1454	$\pm$ 661	3501	$\pm$ 1897	2003	$\pm$ 1453
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	5031	$\pm$ 2439	114885	$\pm$ 20953	34676	$\pm$ 19035
DECIDUALNI LIMFOCITI (DL) *						
Supresija (%)	/		5**		/	
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	1274	$\pm$ 774	66263	$\pm$ 5961	43465	$\pm$ 19574
ADHERENTNE STANICE (AS) *						
Supresija (%)	58	$\pm$ 14	58	$\pm$ 12	/	

PHA - poliklonski mitogen fitohemaglutinin

Con-A - poliklonski mitogen konkanavalin A

$X_S \pm S_X$  - otkucaji u minuti (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška)

\*  $1 \times 10^5$  stanica/50 mikrolitara medija

\*\* u jednom uzorku sa supresijskim učinkom

TABLICA 17. IMUNOSUPRESIJSKI UČINAK DECIDUALNIH LIMFOCITA I ADHERENTNIH STANICA DECIDUE U TESTU BLASTIČNE TRANSFORMACIJE U SKUPINI PONAHLJANIH SPONTANIH POBAČAJA (n = 3)

	SPONTANA PROLIFERACIJA STANICA		STIMULIRANA PROLIFERACIJA STANICA			
	$X_S \pm S_X$		PHA $X_S \pm S_X$		Con-A $X_S \pm S_X$	
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	2450	$\pm$ 921	90041	$\pm$ 23225	34365	$\pm$ 26903
DECIDUALNI LIMFOCITI (DL) *	5758	$\pm$ 3433	6767	$\pm$ 2709	2040	$\pm$ 358
ADHERENTNE STANICE (AS) *	4105	$\pm$ 1539	5618	$\pm$ 1740	4909	$\pm$ 1614
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	6537	$\pm$ 1444	101076	$\pm$ 9508	33084	$\pm$ 22920
DECIDUALNI LIMFOCITI (DL) *						
Supresija (%)	20**		/		12**	
LIMFOCITI PERIFERNE KRVI (LPK) *	10403	$\pm$ 5384	108935	$\pm$ 23664	47072	$\pm$ 38623
ADHERENTNE STANICE (AS) *						
Supresija (%)	/		/		/	

PHA - poliklonski mitogen fitohemaglutinin

Con-A - poliklonski mitogen konkanavalin A

$X_S \pm S_X$  - otkucaji u minuti (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška)

\*  $1 \times 10^5$  stanica/50 mikrolitara medija

\*\* u jednom uzorku sa supresijskim učinkom (Blighted ovum)

proliferacijski odgovor singeničkih limfocita periferne krvi stimuliranih poliklonskim mitogenima PHA i Con-A prikazali smo u Tablici 14.

Spontana proliferacija limfocita periferne krvi trudnice i decidualnih limfocita u kulturi bila je, kao u skupini normalnih trudnoća, identična očekivanoj. U kulturi decidualnih makrofaga i singeničkih limfocita periferne krvi zabilježili smo ukupnu spontanu proliferaciju ponovno veću od očekivane (32%).

Decidualni limfociti u koncentraciji od  $1 \times 10^5$  stanica/50 mikrolitara medija, koje smo dodali u kulturu limfocita periferne krvi stimuliranu s PHA, proizveli su supresiju proliferacijskog odgovora singeničkih limfocita periferne krvi od prosječno 32%. Opisani imunosupresijski učinak decidualnih limfocita na stimuliranu proliferaciju limfocita periferne krvi zabilježili smo u svih osam ispitivanih slučajeva ove vrste patološke trudnoće. Decidualni makrofagi, dodavani u istoj koncentraciji kao i decidualni limfociti, pokazali su supresijski učinak na proliferacijski odgovor limfocita periferne krvi stimuliranih s PHA u šest od osam promatranih slučajeva (75%), ali je njihov supresijski učinak bio veći (43%). U šest od osam kultura singeničkih limfocita periferne krvi koje su bile stimulirane s Con-A, decidualni limfociti i decidualni makrofagi pokazali su imunosupresijski učinak od 42%, odnosno 45%.

U skupini ranih trudnoća missed abortion ukupna spontana proliferacija stanica u kulturi limfocita periferne krvi i decidualnih limfocita bila je veća od očekivane (47%), a to je bio slučaj, samo u manjoj mjeri, i s kulturama limfocita periferne krvi i decidualnih adherentnih stanica (21%). U navedenoj skupini patoloških trudnoća nismo opazili supresijski učinak ni decidualnih limfocita ni decidualnih adherentnih stanica na proliferaciju singeničkih limfocita periferne krvi u kulturama stimuliranim s PHA i Con-A (Tablica 15). Istina, u dva slučaja (22%) trudnoća missed abortion u kojima je stimulacija limfocita periferne krvi izvršena s PHA, pojavila se blaga imunosupresija uzrokovana decidualnim limfocitima (17%) i decidualnim adherentnim

stanicama (14%), što je bilo znatno niže od supresije opažene u normalnoj trudnoći iste gestacijske dobi.

U kulturama pomiješanih limfocita periferne krvi trudnice i limfocita treće osobe zakočenih mitomicinom C, ni u jednom od razrijeđenja suspenzije decidualnih limfocita, nismo opazili ni supresijski ni stimulacijski učinak dodatih decidualnih limfocita na aloantigenima stimuliranu proliferaciju singeničkih limfocita periferne krvi (Tablica 19). U tri pojedinačna slučaja (27%) iz ove skupine patoloških trudnoća zabilježili smo imunosupresijsko djelovanje limfocita decidue od prosječno 15%, samo u koncentraciji od  $2 \times 10^6$  stanica/ml. To je bilo znatno niže od 53% supresijskog učinka u slučajevima normalnih trudnoća iste dobi (Tablica 18).

Za skupinu izvanmaterničnih trudnoća brojčani podaci o učinku decidualnih limfocita i decidualnih adherentnih stanica na proliferaciju singeničkih limfocita periferne krvi nakon stimulacije s PHA i Con-A prikazani su u Tablici 16. U svim slučajevima u kojima je stimulacija izvršena s PHA opazili smo prosječan imunosupresijski učinak decidualnih makrofaga na proliferaciju limfocita periferne krvi od  $58\% \pm 12\%$ , približno kao u normalnim trudnoćama. U tri od četiri spomenuta slučaja (75%) decidualni limfociti nisu, međutim, pokazali supresijski utjecaj na proliferaciju limfocita periferne krvi stimuliranih s PHA, tako da je učestalost pojave supresije od 25% bila značajno niža nego u normalnim trudnoćama ( $p < 0,05$ ).

Bez obzira na koncentraciju decidualnih limfocita koje smo dodavali u kulturu pomiješanih limfocita periferne krvi iste trudnice i limfocita treće osobe koje smo prethodno zakočili mitomicinom C, ni u jednom od tri ispitana slučaja nismo uspjeli dokazati imunosupresijski utjecaj decidualnih limfocita na stimulirani proliferacijski odgovor singeničkih limfocita periferne krvi (Tablica 20).

U skupini ponavljanih spontanih pobačaja spontana proliferacija limfocita periferne krvi trudnice i decidualnih limfocita u kulturi bila je manja od očekivane za 21%, a limfocita periferne krvi i decidualnih makrofaga veća

TABLICA 18. IMUNOSUPRESIJSKI UČINAK DECIDUALNIH LEUKOCITA U PETODNEVNOJ KULTURI POMIJEŠANIH LIMFOCITA U SKUPINI NORMALNIH TRUDNOĆA PRVOG TROMJESEČJA (n = 11)

STANICE U KULTURI	OTKUCAJI/min $\bar{X}_s \pm S_x$	SUPRESIJSKI UČINAK (%) $\bar{X}_s \pm S_x$
RESPONDERSKE STANICE (R)	1230 ± 225	
RESPONDERSKE STANICE x STIMULACIJSKE STANICE (S)	28240 ± 2300	
R x S x D <sub>1</sub> (1 x 10 <sup>5</sup> )	11304 ± 2521	52,9 ± 12,0
R x S x D <sub>2</sub> (0,5 x 10 <sup>5</sup> )	12005 ± 2710	50,1 ± 14,3
R x S x D <sub>3</sub> (0,25 x 10 <sup>5</sup> )	14108 ± 2150	45,3 ± 11,4

R 1 x 10<sup>6</sup> limfocita periferne krvi trudnice

S 2 x 10<sup>6</sup> limfocita periferne krvi treće osobe zakočenih mitomycinom c

D<sub>1-3</sub> količina decidualnih leukocita dodanih u kulturu

$\bar{X}_s \pm S_x$  srednja vrijednost ± standardna pogreška

TABLICA 19. IMUNOSUPRESIJSKI UČINAK DECIDUALNIH LEUKOCITA U PETODNEVNOJ KULTURI POMIJEŠANIH LIMFOCITA U SKUPINI TRUDNOĆA MISSED ABORTION PRVOG TROMJESEČJA (n = 11)

STANICE U KULTURI	OTKUCAJI/min $\bar{X}_s \pm S_x$	SUPRESIJSKI UČINAK (%) $\bar{X}_s \pm S_x$
RESPONDERSKE STANICE (R)	1140 ± 139	
RESPONDERSKE STANICE x STIMULACIJSKE STANICE (S)	29579 ± 2190	
R x S x D <sub>1</sub> (1 x 10 <sup>5</sup> )	29038 ± 2854	nema
R x S x D <sub>2</sub> (0,5 x 10 <sup>5</sup> )	29316 ± 2946	nema
R x S x D <sub>3</sub> (0,25 x 10 <sup>5</sup> )	30954 ± 2124	nema

R 1 x 10<sup>5</sup> limfocita periferne krvi trudnice

S 2 x 10<sup>5</sup> limfocita periferne krvi treće osobe zakočenih mitomicinom c

D<sub>1-3</sub> količina decidualnih leukocita dodanih u kulturu

$\bar{X}_s \pm S_x$  srednja vrijednost ± standardna pogreška

TABLICA 20. IMUNOSUPRESIJSKI UČINAK DECIDUALNIH LEUKOCITA U PETODNEVNOJ KULTURI POMIJEŠANIH LIMFOCITA U SKUPINI IZVANMATERNIČNIH TRUDNOĆA PRVOG TROMJESEČJA (n = 3)

STANICE U KULTURI	OTKUCAJI/min $\bar{X}_s \pm S_x$	SUPRESIJSKI UČINAK (%) $\bar{X}_s \pm S_x$
RESPONDERSKE STANICE (R)	998 ± 112	
RESPONDERSKE STANICE x STIMULACIJSKE STANICE (S)	24740 ± 2355	
R x S x D <sub>1</sub> (1 x 10 <sup>5</sup> )	24984 ± 1093	nema
R x S x D <sub>2</sub> (0,5 x 10 <sup>5</sup> )	25041 ± 1211	nema
R x S x D <sub>3</sub> (0,25 x 10 <sup>5</sup> )	25178 ± 1405	nema

R 1 x 10<sup>5</sup> limfocita periferne krvi trudnice

S 2 x 10<sup>5</sup> limfocita periferne krvi treće osobe zakočeni mitomycinom c

D<sub>1-3</sub> količina decidualnih leukocita dodanih u kulturu

$\bar{X}_s \pm S_x$  srednja vrijednost ± standardna pogreška



za 58% . Decidualni limfociti dodani u kulturu singeničkih limfocita periferne krvi stimuliranu s PHA nisu izazvali supresijski učinak (Tablica 17). U jednom slučaju s blagim supresijskim učinkom decidualnih limfocita radilo se o trudnoći blighted ovum.

U tri kulture pomiješanih limfocita periferne krvi (rezultati su već prikazani u okviru skupine trudnoća missed abortion) stimuliranih s limfocitima treće osobe koji su bili zakočeni mitomicinom C, također nismo dokazali supresijski učinak decidualnih limfocita.

#### 4. RASPRAVA

Za vrijeme rane trudnoće trofoblast invadira deciduu, miometriju i spiralne arteriole i dolazi u intimni dodir s majčinim decidualnim stanicama. Usprkos prisustvu, s jedne strane, brojnih fetalnih stanica trofoblasta koje su genetski različite od majčinog tkiva i velikog broja endometrijskih granulocita u području izrazite invazije trofoblasta (osobito oko spiralnih arteriola i endometrijskih žlijezda) s druge strane, ne razvija se klasična lokalna celularna reakcija majčinog organizma. Izgleda da su fetalne i maternalne stanice u području embriomaternalnog spoja u nekoj vrsti imunološke harmonije odnosno tolerancije (16)

U decidui rane trudnoće dvije su temeljne vrste stanica: velike, poligonalne i glikogenom bogate stromalne stanice i endometrijski granulociti (Kornchenzellen)(94). Funkcije endometrijskih granulocita, osobito njihova uloga u ranoj trudnoći, nisu u potpunosti spoznate, ali se pretpostavlja da reguliraju majčin imunološki odgovor prema fetoplacentarnom alotransplantatu (248).

Populaciju decidualnih leukocita čine dvije dominantne skupine stanica - **decidualni makrofagi i decidualni limfociti**. Prema rezultatima imunohistoloških studija brojnih autora u decidui ranih humanih trudnoća prevladavaju makrofagi (35, 117, 118, 248). Imunohistološkim pretraživanjem bioptičkog materijala uzetog od bazalne i parijetalne decidue humanih trudnoća prvog tromjesečja potvrdili smo veliku gustoću spomenutih stanica u obje vrste decidua i u svim skupinama ispitivanih trudnoća. Kao što je poznato, znatan broj decidualnih makrofaga posjeduje površinski HLA-DR antigen (22, 33) a neki, izgleda, mogu eksprimirati i CD4 antigen (35) koji karakterizira pomagačke T limfocite.

Drugu po brojnosti i rasprostranjenosti značajnu skupinu decidualnih leukocita čine decidualni granulirani limfociti (DGL) koji su karakterističnog fenotipskog obilježja NKH-1+ CD2+ CD3- (22, 222). Naša imunohistološka

studija pokazala je podjednako visok postotak te jednakomjernu raspodjelu DGL u bazalnoj i parijetalnoj decidui. Štoviše, suprotno navodima nekih autora (51, 163, 164, 221), broj decidualnih granuliranih limfocita nije pokazivao bitnije oscilacije ni u ovisnosti od vrste ispitivane trudnoće. Rezultati protočne citometrije kojom smo ispitivali zastupljenost antigena na površini limfocita u suspenzijama decidualnih limfocita potvrđuju rezultate imunohistološke studije. Iako su brojčano nešto slabije zastupljene, CD2+ stanice bile su slično raspoređene u decidualnoj stromi poput NKH-1+ stanica, što upućuje na vjerojatnost da određeni broj DGL (NKH-1+) na svojoj membrani posjeduje ujedno i CD2 antigensku molekulu.

U stromi bazalne i parijetalne decidue normalnih i patoloških trudnoća opazili smo, bez izuzetaka, da ima daleko više CD4+ i CD8+ stanica nego CD3+ stanica. Pokazavši da ukupan broj CD4+ i CD8+ stanica daleko premašuje broj CD3+ stanica ukazali smo na mogućnost da i druge stanice decidue a ne samo zreli T limfociti eksprimiraju spomenute antigene. Ovu smo pretpostavku potvrdili nakon analize površinskih staničnih antigena u suspenzijama decidualnih limfocita metodom protočne citometrije. Budući da suspenzije decidualnih limfocita karakterizira odsustvo stanica strome i decidualnih makrofaga (koji izgleda mogu eksprimirati CD4, ali ne i CD3 antigen), u ovako selekcioniranoj skupini suspendiranih stanica ukupan broj CD4+ i CD8+ stanica morao je, dakle, tek neznatno biti veći od broja CD3+ stanica, u što smo se i osvjedočili. Na temelju same imunohistološke studije teško da možemo preciznije odrediti odnos između CD4+ i CD8+ stanica, tim više što biopsijom uzeti komadići decidualnog tkiva za imunohistološku prerragu ne moraju biti i reprezentativni za cijelu decidualnu ovojnici kad je u pitanju sastav staničnih, a osobito leukocitnih subpopulacija. Ni u kom slučaju ne možemo, međutim, isključiti koekspresiju spomenutih antigena. S druge strane, rezultati imunohistološke studije s velikom vjerojatnošću ukazuju na mogućnost postojanja CD4+CD3- i CD8+CD3- stanica humane decidue.

Osim imunohistološkoj studiji, svakoj drugoj morfološkoj te imunološkoj funkcionalnoj studiji o decidualnim leukocitima kao preduvjet postavlja se priprema suspenzije pojedinih leukocitnih populacija odnosno subpopulacija iz decidualnog tkiva. Mehaničkim metodama stvorene stanične suspenzije izgleda da odražavaju stvarne odnose između pojedinih vrsta stanica u decidui. Naime, rezultat mehaničke dezagregacije decidualnog tkiva su suspenzije koje sadrže gotovo same decidualne epitelne i stromalne stanice i stanični detritus, dok udio decidualnih leukocita ne prelazi u njima 25% (196). Zbog spomenutih činjenica ovakve suspenzije ni u kom slučaju nisu prikladne za ispitivanje decidualnih leukocita. S druge strane, enzimskom digestijom decidualnog tkiva dobivaju se stanične suspenzije bogate leukocitima (koji uz to pokazuju i dobru vijabilnost između 75% i 85%) i minimalno su kontaminirane drugim decidualnim stanicama. Pritom treba napomenuti da kvalitativni sastav stanične decidualne suspenzije i stanične funkcije ovise o vrsti enzima koji se upotrebljavaju za razgradnju decidualnog tkiva i o dužini trajanja ostvarenog kontakta enzima i tkiva (196). Za potrebe naše studije, za razgradnju decidualnog tkiva poslužili smo se 0,125% otopinom tripsina. Tim načinom smo u svim skupinama ispitivanih trudnoća prvog tromjesečja dobili u suspenziji decidualnih stanica značajan udio leukocita (preko 75%), s isto tako visokim postotkom vijabilnosti (preko 90%). U nekoliko slučajeva u skupini trudnoća missed abortion vijabilnost decidualnih leukocita u suspenziji jedva da je prelazila 50% pa takve slučajeve nismo uzimali za daljnja morfološka ni funkcionalna imunološka ispitivanja. Iako Ritson i sur.(196) navode nizak postotak CD2+ stanica (16%-26%) u tri od 12 svojih uzoraka leukocitnih suspenzija nakon tripsinske obrade decidualnog tkiva, mi ni u jednom od 28 naših uzoraka nismo zabilježili udio CD2+ stanica niži od 40%. Zato, ako vrijedi pretpostavka da tripsin može oštetiti CD2 antigensku molekulu, mišljenja smo da treba uvažiti i mogućnost da opsežnost oštećenja ovisi o koncentraciji otopine tripsina i dužini trajanja digestije.

Identifikaciju površinskih biljega u suspenziji decidualnih leukocita izvršili smo pomoću protočne citometrije nakon odstranjivanja adherentne frakcije stanica (decidualni makrofagi) iz suspenzije. Tzv. FACS analiza (engl. Fluorescence Activated Cell Sorter analysis) limfocitnih subpopulacija rađena je na 10000 - 20000 suspendiranih stanica koje smo prethodno tretirali sa specifičnim monoklonskim antitijelima. Za određivanje udjela decidualnih limfocita u spomenutim staničnim suspenzijama koristili smo monoklonsko antitijelo protiv zajedničkog leukocitnog antigena (engl. Leucocyte Common Antigen - LCA) ili CD45. Iz analize smo izostavili mrtve stanice i stanični detritus, a stvarni udio pojedinih limfocitnih subpopulacija u suspenziji decidualnih limfocita odredili smo tako da smo od dobivenog rezultata oduzimali postotak monoklonskim antitijelima nespecifično obojenih stanica. Tako je u suspenzijama decidualnih limfocita u svim skupinama ispitivanih trudnoća prvog tromjesečja postotak CD45+ stanica iznosio između 74% (u skupini izvanmaterničnih trudnoća) i 95% (u skupini trudnoća blighted ovum). Činjenica da decidualni limfociti u suspenziji eksprimiraju zajednički leukocitni antigen CD45 sugerira njihovo porijeklo iz koštane srži (29, 36, 222). Ispitivanje kvantitativnih odnosa između pojedinih limfocitnih subpopulacija nastavili smo u tako izdvojenoj skupini decidualnih limfocita.

U svim uzorcima limfocitnih suspenzija, bez obzira na skupinu ispitivanih trudnoća, najbrojnije su bile CD2+ stanice koje nose receptor E-rozeta (Tablica 2). Njihov postotak koji se prosječno kretao između 53% (u skupini izvanmaterničnih trudnoća) i 67% (u skupini trudnoća blighted ovum) bio je značajno veći od CD3+ stanica koje nose receptor zrelih T limfocita. Prosječni postoci CD3+ stanica bili su približno jednaki u svim skupinama ispitivanih trudnoća (19% - 29%) i među njima nije bilo statistički značajnih razlika. U više imunohistoloških studija nesumnjivo je dokazano prisustvo zrelih T limfocita u decidui humanih trudnoća prvog tromjesečja i obično se navodi malen postotak somenutih stanica (36, 116, 222). Tako je relativno mali broj CD3+ stanica koji smo našli u bioptičkom materijalu u skladu s navodima spomenutih autora. Uspoređujući skupine ispitivanih trudnoća

postotak T limfocita s receptorom za E rozete (CD2+) bio je najmanji u skupini izvanmaterničnih trudnoća, pri čemu smo statistički značajnu razliku našli jedino u odnosu na postotak CD2+ stanica u skupini trudnoća blighted ovum ( $t=2,27$   $p<0,05$ ). Budući da sve intrauterine trudnoće karakterizira neposredan kontakt između trofoblasta i decidue, navedene razlike mogle bi se eventualno objasniti nemogućnošću trofoblasta da neposredno utječe na leukocitni milje u tkivu humane decidue u izvanmaterničnim trudnoćama. Receptor za E rozete prisutan je na kortikalnim i medularnim timocitima i zrelim perifernim T limfocitima (104), a CD3 antigen karakterizira samo zrele T limfocite periferne krvi. Stanice CD2+ CD3- izgleda da neposredno iz koštane srži i bez obrade u timusu podliježu maturaciji i diferencijaciji u decidui i/ili uterinim regionalnim limfnim čvorovima (36).

Zastupljenost CD4+ stanica koje nose antigen pomagačkih T limfocita u suspenziji decidualnih limfocita bila je niska u skupini normalnih trudnoća (6%), u skupini trudnoća blighted ovum (9%) i missed abortion (11%). Najveći postotak CD4+ stanica opazili smo u skupini izvanmaterničnih trudnoća (14,5%) i on je bio statistički značajno veći jedino u odnosu na skupinu normalnih trudnoća ( $t=4,65$   $p<0,005$ ). Budući da je trofoblastno tkivo u normalnoj i anembrionskoj trudnoći intaktno, da u trudnoćama missed abortion dolazi do smrti i propasti trofoblastnih stanica, a da u izvanmaterničnim trudnoćama trofoblast uopće ne ostvaruje neposredan kontakt s majčinom deciduom, izgleda da nadeni postoci CD4+ stanica u suspenziji decidualnih limfocita odražavaju nepovoljan utjecaj trofoblasta na prisustvo spomenutih stanica u decidualnom tkivu. U sve četiri skupine ispitivanih trudnoća našli smo podjednako velik postotak (18%-22%) stanica koje eksprimiraju CD8 antigen (uobičajen za citotoksične/ supresijske T limfocite). Uspoređujući odnos između CD4+ i CD8+ stanica u suspenzijama decidualnih limfocita prema skupinama ispitivanih trudnoća opazili smo da je zastupljenost CD8+ stanica u odnosu na CD4+ stanice, izuzev u skupini izvanmaterničnih trudnoća, statistički značajno veća u svim ostalim skupinama trudnoća ( $t=2,65$   $p<0,05$ ;  $t=2,68$   $p<0,05$ ;  $t=2,87$   $p<0,05$ ).

Dok u perifernoj krvi zbroj CD4+ i CD8+ stanica odgovara broju zrelih T limfocita koje karakterizira CD3 antigen, u suspenziji decidualnih limfocita, odnosno u humanoj decidui normalnih i patoloških trudnoća prvog tromjesečja zbroj postotka CD4+ i CD8+ stanica u pravilu je bio nešto veći od postotka CD3+ stanica (između 4% i 9%). Spomenuto potvrđuje već ranija opažanja da CD4 antigen mogu eksprimirati i druge stanice npr. makrofagi (116, 252). Na temelju imunohistoloških studija Bulmer i sur. (36) ističu da CD3+ stanice u decidui prvog tromjesečja ne eksprimiraju CD8 antigensku molekulu. Tako nalaz ukupnog broja CD4+ i CD8+ stanica koji je bio veći od postotka CD3+ stanica u suspenziji decidualnih limfocita u svim skupinama ispitivanih trudnoća postaje još zanimljiviji. Sve to upućuje na zaključak da CD8 biljeg (kao što smo već rekli za CD4 molekulu), osim zrelih T limfocita, mogu eksprimirati i druge stanice (npr. neke NK stanice - vidi Tablicu 2), a vjerojatnom se drži i mogućnost koekspresije CD4 i CD8 antigenskih molekula na membrani decidualnih limfocita (14). Upravo zbog perzistentnog nalaza većeg ukupnog postotka CD4+ i CD8+ stanica u odnosu na postotak CD3+ limfocita, analiza limfocitnih subpopulacija protočnom citometrijom, kao uostalom i imunohistološka studija, ukazuju s velikom vjerojatnošću na egzistenciju decidualnih limfocita s fenotipskim obilježjima CD4+ CD3- i/ili CD8+ CD3-. Visok postotak CD2+ stanica u suspenzijama limfocita zabilježen u svim skupinama ispitivanih trudnoća prvog tromjesečja i istovremeno malen broj prisutnih CD8+ i, osobito, CD4+ stanica (zreli T limfociti, neke NK stanice, makrofagi) upućuju da su CD2+ decidualni (granulirani) limfociti ujedno i CD3- CD4- CD8- (29, 196, 248).

Po zastupljenosti, u suspenziji decidualnih limfocita odmah iza CD2+ stanica slijedila je limfocitna subpopulacija stanica koja je reagirala s anti-leu-M5 monoklonskim antitijelom. Spomenuto monoklonsko antitijelo specifično reagira s CD11-c antigenom čije je prisustvo dokazano na membrani zrelih monocita, granulocita i velikih granuliranih limfocita (Tablica 2). Treba istaći da je najniži postotak CD11-c+ stanica zabilježen u skupini izvanmaterničnih trudnoća (24%), i da je najvjerojatnije zbog relativno malog

broja ispitanih slučajeva i velikih standardnih devijacija, udio spomenutih stanica bio statistički značajno manji jedino u odnosu na postotak istovrsnih stanica u skupini trudnoća blighted ovum. Odnos CD11-c+ stanica i CD4+ stanica u decidualnim limfocitnim suspenzijama pojedinih skupina ispitivanih trudnoća bio je obrnuto proporcionalan. Imajući u vidu činjenicu da je u decidui izvanmaterničnih trudnoća u odnosu na ostale vrste ispitivanih trudnoća postotak CD4+ stanica relativno najveći, a CD11-c+ stanica najmanji, mogao bi se pretpostaviti posredan ili čak i neposredan utjecaj trofoblasta odnosno fetalnih antigena na prisustvo CD11-c+ i CD4+ stanica u decidualnom tkivu. S obzirom na mali broj CD3+ CD4+ stanica u endometriju izvan trudnoće (31, 167) i u decidui izvanmaterničnih trudnoća, te njihov još manji udio u skupinama ispitivanih intrauterinih trudnoća izvjestan je, na neki način, "nepovoljan" utjecaj trofoblasta na prisustvo CD4 antigena na površini stanica u humanoj decidui prvog tromjesečja. U dostupnoj literaturi nismo našli slična opažanja. Moguće je da se radi i o gubitku antigena na zrelim T limfocitima pod utjecajem trofoblastnih/fetalnih antigena (36). S druge strane, postotak CD8+ stanica u suspenzijama decidualnih limfocita bez obzira na vrstu ispitivane trudnoće pokazivao je konstantnu vrijednost od 18% - 22%, pa bi se moglo zaključiti da trofoblast nema odlučujuću ulogu u regulaciji broja spomenutih stanica u humanoj decidui.

Pomoću monoklonskih antitijela anti-leu-M3 i anti-leu-M1 koja specifično reagiraju sa zrelim monocitima (CD14+) i zrelim granulocitima periferne krvi (CD15+), dokazali smo njihovo jedva zamjetno prisustvo u suspenzijama decidualnih limfocita (manje od 3%), kako u skupini normalnih trudnoća tako i u skupinama patoloških trudnoća prvog tromjesečja. Ovako nizak postotak CD14+ i CD15+ stanica u suspenzijama decidualnih limfocita, koji nije ovisio o vrsti trudnoće, dokazuje uspješno izvedeno izdvajanje decidualnih makrofaga (adherentnih stanica) iz suspenzije decidualnih leukocita pomoću adherencije za plastičnu podlogu. S druge strane, nizak postotak CD14+ makrofaga (manji od 2%) koji inače posjeduju i CD11-c antigensku molekulu



(248), ne slaže se s istovremeno nađenim visokim postotkom CD11-c+ stanica u suspenzijama gotovo čistih decidualnih limfocita. Štoviše, značajan postotak CD11-c+ stanica u suspenzijama decidualnih limfocita zabilježen je u svim skupinama ispitivanih trudnoća prvog tromjesečja (normalnih i patoloških). Uspoređujući postotke CD2+, CD3+, CD11-c+ i CD16+ stanica u suspenzijama decidualnih limfocita došli smo do mogućeg objašnjenja prethodno iznesenih opažanja. Kad smo od postotka CD2+ stanica redom oduzeli postotke CD3+ stanica (zreli T limfociti) i CD16+ stanica (makrofagi i NK stanice) dobiveni rezultat upravo je odgovarao postotku CD11-c+ stanica u dotičnoj suspenziji decidualnih limfocita. Većinu stanica u suspenziji decidualnih limfocita čine inače decidualni granulirani limfociti (DGL) čija su fenotipska obilježja CD2+ CD3- NKH-1+ CD16- CD38+ (197). Budući da smo istovjetna opažanja zabilježili u sve četiri skupine ispitivanih trudnoća, mala je vjerojatnost da se radi o slučajnom nalazu. Drugim riječima, izgleda da decidualni granulirani limfociti mogu na svojoj membrani eksprimirati i CD11-c antigen. Spomenuta opažanja naknadno smo potvrdili metodom dvostrukog obilježavanja površinskih antigena (Facs analiza). Monoklonsko antitijelo na NKH-1 (CD56) antigen, anti- Leu-7 (Becton Dickinson), obilježavali smo direktno s fikoeritriinom (PE), a monoklonsko antitijelo za CD11-c antigen, anti-Leu-M5 (Becton Dickinson), indirektno s fluoresceinom (FITC). Na taj smo način praktično dobili potpunu podudarnost u lokalizaciji eksprimiranih površinskih NKH-1 i CD11-c antigena, odnosno DGL koji su specifično reagirali s anti-Leu-7 monoklonskim antitijelom istovremeno su bili vezali i anti-Leu- M5 antitijelo.

Rezultati dobiveni FACS analizom površinskih staničnih biljega u suspenziji decidualnih limfocita podudaraju se s nalazima drugih autora (197). Najzastupljenija je subpopulacija stanica s CD2+ biljekom koje su uz to u visokom postotku NKH-1+ i CD38+. To je subpopulacija decidualnih granuliranih limfocita, koja ima morfološke karakteristike velikih granuliranih limfocita periferne krvi (106, 197). Nedavno su Starkey i sur. (222), nakon analize NKH-1+ decidualnih limfocita u protočnom citometru, izvjestili da

14%-100% spomenutih stanica istovremeno eksprimiraju i CD2 antigensku molekulu. Velike varijacije u rezultatima, odnosno zaključak autora da ima CD2+ i CD2- NKH-1+ stanica mogli bi biti i neposredna posljedica enzimske obrade decidualnog tkiva, jer je poznato da neki enzimi (osobito pronaza) prilikom razgradnje decidualnog tkiva oštećuju CD2 antigensku molekulu na površini decidualnih limfocita (196).

NK stanice (engl. natural killer) periferne krvi posjeduju MHC neovisnu NK aktivnost i supresijsko djelovanje (97, 137), a njihov temeljni antigenski fenotip je NKH-1+ CD2+ CD3- CD16+ CD8+/- . Izgleda da je njihovo porijeklo iz koštane srži, ali se tijekom razvojnog ciklusa ne obrađuju dodatno u timusu (CD3-). Jedna od mogućnosti je da su spomenute stanice predstadiji citolitičkih T stanica i kao takve dio primitivnog imunološkog sustava (112). Lanier i sur. (136) su, međutim, opisali NK staničnu subpopulaciju koja čini manje od 2% granuliranih limfocita periferne krvi, koja je NKH-1+ te najčešće i CD2+, ali za koju je karakteristično odsustvo CD16 antigena i antigenskog obilježja zrelih T limfocita (CD3-). Zbog toga su decidualni granulirani limfociti fenotipskih obilježja CD2+ CD3- CD16- NKH-1+ (CD11-c+), kao što smo i mi pokazali protočnom citometrijom, slični upravo spomenutoj maloj subpopulaciji NK stanica periferne krvi (195, 222). Ove stanice u usporedbi s CD16+ NK stanicama periferne krvi pokazuju slabiju citotoksičnu aktivnost prema K562 staničnoj liniji (197). Isto tako nisku citotoksičnu aktivnost prema K562 stanicama pokazuju i decidualni granulirani limfociti. Niska razina citotoksičnosti mogla bi biti stvarna, ali i uzrokovana vrstom i trajanjem postupaka u pripremi suspenzije decidualnih limfocita (196, 197). Spomenuta niska razina citotoksičnosti decidualnih granuliranih limfocita nije se uspjela podići prethodnom inkubacijom s gama interferonom, niti se visokim dozama IL-2 uspjela izazvati LAK aktivnost (110).

Prisustvo NK stanica otkriveno je i u decidui štakora i svinje (56, 58). Analogne humanim endometrijskim leukocitima, granulirane metrijalne žljezdane stanice u mišjoj decidui (engl. granulated metrial land cells - GMG)

imaju također porijeklo iz koštane srži i in vitro pokazuju neposredno citotoksično djelovanje na stanice mišjeg trofoblasta (224). Iako je ranije izvješćeno da je blastocista štakora rezistentna na lizu posredovanu NK stanicama (56), novije studije pokazuju osjetljivost trofoblasta u štakora na lizu posredovanu limfokinima aktiviranim stanicama ubicama (engl. LAK cell lysis)(70).

Imunohistološkom pretragom uzoraka decidualnog tkiva te analizom staničnih površinskih biljega u suspenzijama decidualnih limfocita pomoću protočne citometrije nismo našli značajne razlike u zastupljenosti stanica s antigenskim fenotipom NKH-1+ CD2+ CD3- CD16- CD11-c+ između skupine normalnih trudnoća i skupina patoloških intrauterinih trudnoća prvog tromjesečja. Limfociti sa spomenutim fenotipskim obilježjem, kako smo već spomenuli, predstavljaju decidualne granulirane limfocite pa bi mogli zaključiti da broj spomenutih stanica (DGL) ne bi sam trebao igrati presudnu ulogu u ishodu humane trudnoće prvog tromjesečja. Eventualne razlike između normalnih i patoloških trudnoća (blighted ovum i missed abortion) možda bi trebalo tražiti u funkcijskim poremećajima ovih stanica, iako će i tada biti gotovo nemoguće procijeniti da li su prisutni poremećaji u djelovanju DGL primarni ili sekundarni u odnosu na smrt i odbacivanje embriotrofoblasta.

Potencijalna uloga decidualnih granuliranih limfocita u normalnoj humanoj trudnoći mogla bi, osim u implantaciji blastociste, biti i u ograničavanju trofoblastne invazije decidue (127), iako još nema dobro dokumentiranih dokaza za neposrednu citotoksičnost DGL (197). U in vitro pokusima, naime, nije otkrivena citotoksičnost humanih decidualnih limfocita u suspenziji prema kultiviranim stanicama trofoblasta, a još ne postoje ni dokazi za citolitičku aktivnost DGL in vivo (124, 145). U slučajevima patoloških trudnoća, osobito onih koje karakterizira smrt i liza embrija i trofoblasta, moguće je da DGL postaju mnogo djelotvorniji citotoksični efektori nego što su to u normalnim uvjetima. Spomenutu mogućnost potvrdila je, naime, izražena NK aktivnost DGL u jednom od deset ispitivanih uzoraka decidue normalnih trudnoća prvog tromjesečja (197).

U normalnim humanim trudnoćama izgleda da majčini T limfociti u decidui mogu stimulirati rast trofoblasta otpuštajući limfokine u područje embriomaternalnog spoja (6). Ako bi to bio jedan od načina kojim su DGL uključeni u kontrolu proliferacije i invazije trofoblasta, onda bi izostajanje spomenute sekrecijske aktivnosti uz pojavu NK aktivnosti DGL u patološkim trudnoćama (osobito missed abortion) moglo biti uzrokom uništenja trofoblastnog tkiva.

Ritson i Bulmer (197) su izvjestili o nesposobnosti proliferacije DGL nakon stimulacije mitogenima i limfokinima. Opaženu nisku razinu proliferacije stanica nakon stimulacije oni, naime, pripisuju kontaminaciji kulture s CD3+ T limfocitima. Isti autori pokušavaju nemogućnost proliferacije DGL objasniti njihovom fiziološkom starosti, odnosno ulaskom u posljednju etapu njihovog životnog vijeka. Ne treba ispustiti iz vida ni mogući utjecaj hormona na proliferaciju i funkcijske sposobnosti DGL (228), iako dodatkom progesterona, estrogena i luteinizirajućeg hormona u kulturu ne dolazi do stimulirane proliferacije spomenutih stanica (197). Granulirani limfociti otkriveni su i u epitelnom sloju humanog endometrija, ali dosad nije dokazana ni njihova NK aktivnost (38). Iako odnosi između intraepitelijalnih i stromalnih endometrijskih granuliranih limfocita nisu u potpunosti jasni, funkcionalne sličnosti između granuliranih limfocita crijevnog epitela i decidualnih granuliranih limfocita (197) ukazuju na ulogu ovih limfocitnih subpopulacija u lokalnom sustavu imunološke obrane.

U ispitivanim suspenzijama decidualnih limfocita normalnih i patoloških trudnoća udio CD22+ stanica koje odgovaraju B limfocitima, nije ni u jednoj skupini trudnoća prelazio 2,3%. Ovo je u skladu s rezultatima naše imunohistološke studije te s nalazima drugih istraživača (21, 36, 116, 127). Uloga B limfocita u decidualnom tkivu nije još uvijek dovoljno upoznata.

Imunohistološkom analizom bioptičkih uzoraka bazalne i parijetalne decidue iz normalnih trudnoća opazili smo nepravilno raspoređene i brojčano oskudne gamma/delta TCR+ stanice. Pretežno smo ih lokalizirali u

citoplazmi epitelnih stanica decidualnih žlijezda. Yeh i sur. (254) istraživali su prisustvo gamma/delta TCR+ stanica u endometriju izvan trudnoće i ustanovili u sekrecijskoj fazi menstruacijskog ciklusa, u odnosu na proliferacijsku fazu, postojaniju reakciju specifičnih monoklonskih antitijela s epitelom endometrijskih žlijezda. Zaključili su da je ekspresija spomenutih antigena ovisna o lokalnoj hormonalnoj regulaciji. Gamma/delta TCR+ epitelne stanice endometrijskih žlijezda istovremeno su bile CD3- CD4- CD8- (254). Isti autori navode gubitak MHC antigena klase I na površini epitelnih stanica decidualnih žlijezda u ranoj trudnoći. Iako je funkcija gamma/delta TCR molekula u maternalnom imunom odgovoru prema fetalnim alogeničkim stanicama nejasna, izgleda da ove imaju sposobnost prepoznavanja stanica s nekonvencionalnim antigenima klase I, osobito ako te posjeduju i CD8 površinski antigen (112).

Udio HLA-DR+ stanica u suspenzijama decidualnih limfocita razlikovao se s obzirom na vrstu ispitivane trudnoće. Najniži prosječni postotak stanica koje nose HLA-DR antigen (7% - 8%) zabilježili smo u decidualnoj limfocitnoj suspenziji ispitivanih izvanmaterničnih trudnoća. Znatno veći prosječan udio HLA-DR+ stanica u limfocitnoj suspenziji našli smo u decidui normalnih trudnoća (14%), u skupini trudnoća missed abortion (16%) i skupini trudnoća blighted ovum (19% - 20%). Pritom je statistički značajna razlika u postocima HLA-DR+ stanica postojala između skupina izvanmaterničnih trudnoća s jedne te trudnoća missed abortion ( $t=5,16$   $p < 0,001$ ) i trudnoća blighted ovum ( $t=5,51$   $p < 0,001$ ) s druge strane. Starkey i sur. (222) navode sličan podatak o 19% HLA-DR+ stanica u suspenziji stanica humane decidue prvog tromjesečja. Iako navedeni postotak HLA-DR+ stanica približno odgovara našim rezultatima nađenim u skupinama intrauterinih trudnoća (normalnih i patoloških), treba međutim uočiti temeljnu i vrlo važnu razliku između dviju studija. Naime, spomenuti su postotak HLA-DR+ stanica Starkey i sur. odredili pomoću protočne citometrije u suspenziji decidualnih stanica, a mi smo ga istom metodom dobili u suspenziji decidualnih limfocita. U studiji Starkeya i sur. (222) HLA-DR+ stanice bile su i CD2- pa

su isti autori, koristeći se podacima iz imunohistoloških studija Bulmera i Johnsona (26, 28), prepostavili da se radi o makrofagima zajedno s vrlo malim udjelom B limfocita. Mislimo da bi objasniti rezultate naše studije u vezi s postocima HLA-DR+ stanica na spomenuti način bilo neopravdano. Naime, adherencijom za plastičnu podlogu već smo izdvojili decidualne makrofage, a njihovo jedva zamjetno prisustvo u suspenziji decidualnih limfocita dokazali smo nađenim vrlo niskim postotkom CD14+ stanica (CD14 antigen karakterističan je za makrofage) i niskim postotkom CD4+ stanica (CD4 antigen mogu eksprimirati izgleda i makrofagi). Za B limfocite već smo pokazali da ni u jednoj od skupina ispitivanih trudnoća njihov udio ne prelazi 2% analiziranih decidualnih limfocita. Budući da DGL također ne posjeduju HLA-DR antigensku molekulu na svojoj membrani (222), ostaje kao mogućnost da HLA-DR+ stanice u suspenziji decidualnih limfocita predstavljaju aktivirane T limfocite (Tablica 2), za koje je poznato da nose HLA-DR antigen (36). Dokaz više da HLA-DR+ stanice ne predstavljaju samo makrofage nalazimo u novijoj studiji Dormana i sur. Oni su u suspenzijama decidualnih limfoidnih i nelimfoidnih stanica, u kojima su dokazali prisustvo HLA-DR+ pozitivnih stanica, našli vrlo mali broj makrofaga s karakterističnim CD14 antigenskim obilježjem (68). Bulmer i Johnson (28) ispitivali su pomoću metode dvostrukog imunoenzimatskog bojenja ekspresiju klase II HLA antigena na T limfocitima i makrofagima u blizini žlijezda humane decidue. Za detekciju klase II HLA antigena autori su koristili monoklonska antitijela NFK-1 i DAKO-HLA-DR, nakon čega su tkivo tretirali s anti-Leu-M3 monoklonskim antitijelom koje specifično reagira s tkivnim makrofagima i anti-Leu-5 i/ili DAKO-T2 antitijelima koji reagiraju s T stanicama. Najmanje 70% populacije leukocita u blizini decidualnih žlijezda odnosilo se na HLA-DR+ stanice. Većina leukocita unutar agregata mononuklearnih stanica u blizini žlijezda bilo je također HLA-DR pozitivno. Autori su dalje našli da je većina HLA-DR+ stanica oko endometrijskih žlijezda i oko 50% HLA-DR+ stanica unutar mononuklearnih agregata specifično reagirala s anti-Leu-M3 monoklonskim antitijelom. Identični podaci mogu se naći i kod drugih autora

(64). Budući da je unutar spomenutih mononuklearnih agregata preko 50% leukocita reagiralo i s anti-Leu-5 i DAKO-T2 monoklonskim antitijelima, rezultati su ukazivali na mogućnost da dio T limfocita istovremeno može ekspimirati i HLA-DR antigensku molekulu. Dvostrukim imunoenzimatskim bojenjem autori su nesumnjivo dokazali da je manji dio T limfocita pokazivao istovremeno prisustvo HLA-DR i Leu-5 (CD2) antigenskih markera. Ove stanice bile su pojedinačno smještene u blizini decidualnih žlijezda i unutar agregata mononuklearnih stanica. Autori na kraju zaključuju da, za razliku od većine decidualnih T limfocita, manji njihov dio uz maternalne decidualne žlijezde eksprimira i klasu II HLA antigena (28). Štoviše, isti autori (28) navode rezultate radova DeWolfa i sur., Morettae i sur. i Wollmana i sur. kojima su dokazali postojanje, in vitro i in vivo, T limfocita koji u uvjetima aktivacije ekspimiraju HLA-DR antigene. Bevan i sur. (14) na T limfocitima štakora prikazuju, također, de novo ekspresiju HLA-DR antigena. HLA-DR antigenske molekule čija je ekspresija na površini aktiviranih T limfocita dokaz imunološke zadaće spomenutih stanica (22), mogle bi imati ulogu u mehanizmu koji regulira proliferaciju drugih T limfocita, npr. citotoksičnih, budući da je nađeno da monoklonska antitijela protiv monomorfne determinante HLA-DR molekule mogu blokirati IL-2 posredovanu proliferaciju T limfocita (28).

Clark i sur. (47) i Slapsys i sur. (221) objavili su opažanje prema kojem populacija malih granuliranih supresijskih limfocita (ne nose markere klasičnih T limfocita) u mišjoj decidui rane trudnoće ima temeljnu ulogu za normalan razvoj i preživljavanje fetoplacentne jedinice. Autori su, naime, pokazali da je ova supresijska aktivnost posredovana solubilnim faktorom koji blokira odgovor limfocita na IL-2 i da se spomenuta supresijska aktivnost ne može inhibirati dodatkom čistog IL-2 u visokim dozama. Bulmer i Johnson (29) iznose rezultate prema kojima IL-2 produciraju aktivirani T limfociti u decidui, ali su drugi decidualni limfociti nesposobni odgovoriti proliferacijom na prisutni IL-2. Isti autori iznose hipoteze o nemogućnosti ekspresije IL-2 receptora na površini decidualnih T limfocita, o eventualnoj inhibiciji indukcije

već postojećih IL-2 receptora na T limfocitima, te o inhibiciji vezivanja IL-2 za istoimene receptore.

Praktično identičan postotak CD8+ stanica (supresijski i citotoksični T limfociti i neke NK stanice) u suspenzijama decidualnih limfocita u svim skupinama ispitivanih trudnoća (normalnim i patološkim) te nizak postotak CD4+ stanica (pomagački T limfociti, ali i neke druge stanice) osobito u skupinama intrauterinih trudnoća, potvrđuju, uz prethodno navedene moguće uzroke (29), insuficijentnu aktivnost IL-2 u decidui rane humane trudnoće. Sve veći udio HLA-DR+ stanica (za koje smo pokazali da su vjerojatno aktivirani T limfociti) u suspenzijama decidualnih limfocita u normalnim trudnoćama pa u trudnoćama missed abortion i blighted ovum, koje bi ujedno trebale lučiti i adekvatno veće količine IL-2, nije ni u jednoj skupini intrauterinih trudnoća pokazao utjecaj na broj CD4+ i CD8+ stanica. Drugim riječima, ni potencijalno veće količine IL-2 nisu omogućile njegovo vezanje za IL-2 receptore na površini decidualnih T limfocita (ako receptori uopće i postoje) pa to rezultira nemogućnošću proliferacije T limfocita i izostankom stvaranja citotoksičnih T limfocita u decidui. Golender i sur. (91) pokazali su već ranije da tkivo decidue u ranoj trudnoći u in vitro uvjetima ima jače imunosupresijsko djelovanje od placentnog tkiva. Zato se pretpostavlja da se u normalnim uvjetima u decidui izlučuju inhibitori IL-2 (43) i da upravo mehanizam lokalne IL-2 inhibicije predstavlja zaštitu genetski stranog embrija u najranijim stadijima humane trudnoće (29).

U suspenzijama limfocita decidue izvanmaterničnih trudnoća, između zastupljenosti CD4 i HLA-DR površinskih antigena postojala je statistički značajna razlika u korist CD4 antigena ( $t=3,72$   $p < 0,05$ ). Upravo suprotno opazili smo među suspendiranim decidualnim limfocitima u trudnoćama unutar maternice, bez obzira na vrstu trudnoće. U intrauterinim trudnoćama, naime, HLA-DR površinski antigeni bili su statistički značajno više zastupljeni od CD4 antigena (razine statističke značajnosti iznosile su u skupini trudnoća missed abortion  $t=2,20$   $p < 0,05$ ; u skupini normalnih trudnoća  $t=3,00$   $p < 0,05$  i u skupini trudnoća blighted ovum  $t=3,50$   $p < 0,005$ ).



Značajno veći udio HLA-DR+ stanica u decidui intrauterinih trudnoća u odnosu na njihovo prisustvo u decidui u izvanmaterničnim trudnoćama ukazuje na moguću indukcijsku ulogu trofoblasta u aktivaciji decidualnih T limfocita. Trofoblast bi, naime, mogao aktivirati decidualne T limfocite u neposrednom kontaktu fetalnih antigena i decidue ili posredstvom solubilnih tvari. Bulmer i Sunderland (36), u okviru imunohistološke studije o limfoidnim staničnim populacijama u humanoj decidui prvog tromjesečja, navode veliki broj limfoidnih stanica koje su eksprimirale OKT10 antigen - marker mijeloidnih i limfoidnih nezrelih stanica i aktiviranih T i B limfocita. Oni postavljaju hipotezu prema kojoj bi ekspresija OKT10 antigena na spomenutim T stanicama mogla biti rezultat daljnje obrade već zrelih T limfocita u decidui, možda kao odgovor na nepoznate trofoblastne (fetalne) antigene ili kao dio ukupne decidualne reakcije. U tom slučaju markeri nezrelih ili aktiviranih stanica bi se ponovno eksprimirali, dok bi se markeri zrelih T limfocita izgubili. Ovo bi se moglo dogoditi kao rezultat aktivacije T limfocita, jer je poznato da mitogenima aktivirani T limfociti mogu reeksprimirati OKT10 marker (36). Naši rezultati koji pokazuju ovisnost između decidualnih HLA-DR+ stanica i prisustva trofoblasta izgleda da potvrđuju pretpostavku Bulmera i sur. o reekspresiji antigena nezrelih/aktiviranih stanica na već zrelim decidualnim T limfocitima. Naime, imunohistološka studija ukazala je na slabu zastupljenost CD3+ stanica (marker zrelih T limfocita) u decidui intrauterinih trudnoća prvog tromjesečja, a daljnji dokaz spomenute ovisnosti predstavlja i Facs analizom utvrđeni najveći postotak CD4+ stanica (pretežno zreli pomagački T limfociti) upravo u izvanmaterničnim trudnoćama, gdje ne postoji kontakt između decidue i trofoblasta, te značajno smanjeno prisustvo istih stanica u decidui normalnih i patoloških intrauterinih trudnoća u kojima se deciduohorionski kontakt neposredno ostvaruje.

Uspoređujući zastupljenost površinskih staničnih antigena u suspenzijama limfocita decidue prvog tromjesečja trudnoće i perifernoj krvi trudnica zabilježili smo nekoliko zanimljivih opažanja. Prije svega, sastav i

odnosi između leukocitnih subpopulacija u perifernoj krvi trudnica nisu ovisili o vrsti ispitivane trudnoće. Tako je za sve ispitane uzorke periferne krvi trudnica karakterističan bio značajno veći udio CD4+ stanica u odnosu na CD8+ stanice (omjer stanica CD4+/CD8+ >1) i HLA-DR+ stanice (omjer CD4+/HLA-DR+ >1). Među najslabije zastupljenim stanicama bile su CD11-c+ stanice. Odnosi između pojedinih limfocitnih subpopulacija u suspenzijama decidualnih limfocita intrauterinih trudnoća bili su posve drugačiji. U njima smo, naime, opazili potpunu inverziju u odnosima između CD4+ i CD8+ stanica (omjer CD4+/CD8+ <1) te CD4+ i HLA-DR+ stanica (omjer CD4+/HLA-DR+ <1), dok je CD11-c antigen postao značajno prisutniji od CD4, CD8 i HLA-DR antigena. Visoki postotak CD11-c+ stanica u decidui intrauterinih trudnoća teško bi mogao biti rezultat pukog prijelaza granuliranih limfocita iz krvi u decidualno tkivo, već najvjerojatnije nastaje i kao posljedica dodatne proliferacije/migracije ovih stanica koju inducira i stimulira funkcionalno sposobni trofoblast. Spomenutu tvrdnju potkrepljuju razlike nađene između limfocitnih suspenzija decidualnog tkiva materničnih i izvanmaterničnih trudnoća. Naime, jedino je u skupini izvanmaterničnih trudnoća odnos CD4/HLA-DR površinskih antigena bio u korist CD4 antigena (kao u perifernoj krvi trudnica) i jedino u ovoj skupini trudnoća prvog tromjesečja nije postojala statistički značajna razlika u udjelu CD4+ i CD8+ stanica, te CD11-c+ stanica u odnosu na CD3+ stanice. Statistički značajno veći udio CD4 antigena ( $t=3,72$   $p< 0,05$ ) i CD8 antigena ( $t=3,46$   $p< 0,05$ ) u odnosu na HLA-DR površinske antigene u decidui izvanmaterničnih trudnoća možda je rezultat već spomenute nemogućnosti obrade zrelih T limfocita od strane fetalnih/trofoblastnih antigena (36), koja se u intrauterinim trudnoćama, pretpostavljamo, redovno odvija.

Decidualne granulirane limfocite (CD2+ CD3- CD11-c+ CD16-) našli smo podjednako zastupljene u suspenzijama decidualnih limfocita u svim skupinama ispitivanih trudnoća, s izuzetkom izvanmaterničnih trudnoća. Upravo spomenutim stanicama, ali i makrofagima, mnogi autori pripisuju značajnu ulogu u okviru složenog protektivnog imunološkog mehanizma koji

čuva embrioplacentnu jedinicu od reakcije odbacivanja (HvG reaction). Zato smo ispitivali funkcionalnu reaktivnost decidualnih limfocita i makrofaga nakon stimulacije poliklonskim mitogenima i aloantigenima.

Lauritsen i sur. (140) su u jednosmjernoj reakciji pomiješanih limfocita pokazali da i u slučajevima ponavljanih spontanih pobačaja postoji uredan proliferacijski odgovor limfocita periferne krvi nakon aloantigenske stimulacije.

U našoj studiji zanimljivo opažanje bila je veća spontana proliferacija decidualnih limfocita i decidualnih makrofaga u odnosu na singeničke limfocite periferne krvi u svima skupinama ispitivanih trudnoća. Pritom je spontana reaktivnost decidualnih limfocita i makrofaga bila višestruko veća od spontane reaktivnosti limfocita periferne krvi jedino u normalnim trudnoćama (Tablica 8) i skupini trudnoća blighted ovum (Tablica 9). Spomenuto opažanje moglo bi se objasniti prethodnom obradom decidualnih leukocita od strane vijabilnog trofoblasta koji, za razliku prema drugim vrstama ispitivanih trudnoća, upravo karakterizira normalne trudnoće i trudnoće blighted ovum. Decidualni makrofagi su u odnosu na decidualne limfocite pokazivali jaču spontanu aktivnost jedino u skupini trudnoća missed abortion. Možda je i propast embrioplacentne jedinice u spomenutim trudnoćama u vezi s pojačanom aktivnosti decidualnih makrofaga. Naime, i smanjena plodnost u žena s endometriozom i kontracepcijska aktivnost intrauterinog uložka (190) povezuju se s većim brojem i većom aktivnosti lokalno prisutnih makrofaga.

Nakon stimulacije poliklonskim mitogenima (PHA, Con-A) decidualni limfociti i decidualni makrofagi pokazivali su u odnosu na singeničke limfocite periferne krvi izrazito slabu proliferaciju. Spomenuti nalaz vrijedio je za sve skupine ispitivanih trudnoća. Pritom su decidualni limfociti nakon stimulacije s PHA proliferirali nešto jače nego decidualni makrofagi. Stimulacija s Con-A nije inducirala značajniji proliferacijski odgovor, a to je iskustvo i drugih autora (197). Budući da je u decidui ispitivanih trudnoća prvog tromjesečja najveći udio granuliranih limfocita koji slabo ili nikako ne proliferiraju nakon

stimulacije mitogenima (195, 197), pretpostavlja se da je opažena proliferacija nakon stimulacije s PHA i Con-A rezultat proliferacije zrelih T limfocita. Potvrdu smo dobili nakon in vitro izvršene deplecije CD3+ stanica u normalnim trudnoćama, kad se ionako slab proliferacijski odgovor decidualnih limfocita na PHA još i smanjio za približno 25% (neobjavljeni podaci). Posredan dokaz prethodne tvrdnje je i snažan proliferacijski odgovor limfocita periferne krvi trudnice na stimulaciju s PHA i Con-A, budući da smo u limfocitnim suspenzijama periferne krvi, bez obzira na vrstu ispitivane trudnoće, dokazali da najveći udio pripada CD3+ limfocitima (između 60% i 70%). Slab proliferacijski odgovor DGL na stimulaciju poliklonskim mitogenima Ritson i Bulmer (197) pokušavaju objasniti fiziološkom starosti ovih stanica. Naime, u endometriju proliferacijske faze menstrualnog ciklusa DGL su prisutni tek u malom broju (197), u sekrecijskoj fazi (31, 118, 128, 167) i u prvom tromjesečju trudnoće (22, 248) broj im se znatno povećava, da bi s napredovanjem trudnoće postepeno iščezli (36). Često samo u sekrecijskoj fazi endometrijskog ciklusa endometrijski granulirani limfociti (EGL) pokazuju mitotičku aktivnost (197). Spomenuto slično životnim fazama granuliranih limfocita - njihovom nastanku, razvoju, starenju i umiranju. Nije dokazano da bi lokalna promjena hormonskog miljea utjecala na proliferaciju DGL (228). Za Bulmera i Johnsona (29) izostanak proliferacije DGL i stvaranja citotoksičnih T limfocita u decidui posljedica je insuficijentnog djelovanja IL-2 u decidui rane trudnoće. Oni vjeruju da se IL-2 stvara u decidui, ali potencijalne efektorske T stanice nisu sposobne eksprimirati IL-2 receptore kao odgovor na induksijsko djelovanje IL-1, gama interferona i sličnih tvari. Isti autori iznose mišljenje prema kojem lokalni IL-2 inhibitor može spriječiti i vezivanje IL-2 molekule za specifični receptor. Ritson i Bulmer (195) navode rezultate iz rada Clarka i sur. prema kojima su za inhibiciju limfocitnog odgovora na IL-2 u mišjoj decidui iz alogeničkih trudnoća odgovorne supresijske stanice. Odnosi među decidualnim stanicama mogli bi također biti značajni za rast i proliferaciju DGL.

Imunoregulacijske sposobnosti decidualnih limfocita i decidualnih makrofaga, nakon što smo ih izdvojili iz suspenzije decidualnih leukocita, ispitivali smo u testovima blastične transformacije i reakcijama pomiješanih limfocita.

U testovima blastične transformacije singeničkim limfocitima periferne krvi (responderske stanice) dodavali smo imunoregulacijske stanice (decidualni limfociti i adherentne stanice) u omjeru 1 : 1, budući da smo u prethodnim istraživanjima najveći imunosupresijski učinak decidualnih leukocita opazili upravo u navedenom omjeru stanica. U skupini trudnoća blighted ovum (Tablica 14) i skupini normalnih trudnoća (Tablica 13) zabilježili smo podjednako velik supresijski učinak decidualnih limfocita i decidualnih adherentnih stanica na proliferaciju singeničkih limfocita periferne krvi nakon stimulacije s PHA. Štoviše, supresiju smo u obje skupine trudnoća prvog tromjesečja našli u svim ispitanim uzorcima. U skupini trudnoća blighted ovum, u kojoj smo utvrdili visok postotak kromosomskih aberacija, nismo opazili razlike u visini supresijskog učinka između slučajeva s normalnim kariotipom i onih s nekom od utvrđenih kromosomopatija. Michel i sur. izvjestili su o sličnim iskustvima (164). Dok se u normalnim trudnoćama supresijski učinak decidualnih limfocita i makrofaga na proliferaciju limfocita periferne krvi stimuliranu s Con-A nije dokazao, u šest od osam uzoraka decidue iz trudnoća blighted ovum postojao je blagi supresijski učinak (prosječno 15% - 19%) kod obje subpopulacije stanica. Spomenuti supresijski učinak bio je i veći (42% - 45%) kad smo u kalkulaciju uzeli samo šest uzoraka sa izraženom supresijom. Daya i sur. (59) dokazali su, međutim, supresijsku aktivnost decidualnih limfocita na proliferaciju limfocita periferne krvi nakon stimulacije s Con-A u 12 od 15 uzoraka decidue iz normalnih trudnoća od 10 do 11 tjedana. Nađena prosječna supresija od 16% istovjetna je s našim rezultatima u skupini trudnoća blighted ovum.

Nepostojanje značajnijih razlika u učestalosti javljanja supresije i visini opažene supresije od strane decidualnih limfocita i decidualnih adherentnih

stanica povezuje skupine normalnih trudnoća i trudnoća blighted ovum i ukazuje na važnu ulogu trofoblasta u indukciji supresijske aktivnosti decidualnih limfocita. Za obje vrste trudnoća karakterističan je, naime, neposredan kontakt između decidue i intaktnog, vijabilnog trofoblastnog tkiva. Prethodno smo pokazali da između spomenute dvije vrste ispitivanih trudnoća nema značajnih razlika ni u udjelu pojedinih limfocitnih subpopulacija u suspenzijama decidualnih limfocita pa je to dokaz više o značaju samog trofoblasta za normalno funkcioniranje lokalnih imunoloških mehanizama sa ciljem očuvanja embrioplacentne jedinice u majčinom organizmu.

Clark i sur. (52) našli su najveću supresijsku aktivnost mišje decidue upravo u vrijeme kad stanice trofoblasta počinju eksprimirati paternalne antigene glavnog sustava gena tkivne snošljivosti (četiri do pet dana nakon implantacije blastociste) pa se može pretpostaviti da se lokalni supresijski mehanizmi induciraju/stimuliraju funkcionalno sposobnim trofoblastom. Spomenuti nalaz Clarka i sur. potvrđuje pretpostavku Bulmera i Johnsona (29, 36) da T limfociti u decidui postaju funkcionalno sposobni u smislu supresijske aktivnosti tek nakon obrade od strane paternalnih/ fetalnih antigena. Izgleda da u endometriju trofoblast može potaći na aktivnost barem dvije populacije supresijskih stanica, velike i male limfocite, jedne pomoću solubilnih indukcijskih tvari a druge tek u neposrednom kontaktu (61). Za supresijski učinak mišje decidue odgovorni su mali granulirani limfociti bez markera zrelih T limfocita, a analognu populaciju stanica sa supresijskim učinkom u humanoj decidui čine decidualni granulirani limfociti koji sedimentiraju 4 - 4,3 mm/sat (60, 61). Clark i sur. (51) i Slapsys i sur.(221) opazili su deficit spomenutih stanica sa supresijskim učinkom u slučajevima spontanih pobačaja.

Nakon stimulacije decidualnih limfocita s PHA ustanovili smo metodom indirektno imunofluorescencije da se u kulturi nalaze gotovo isključivo CD3+ i NKH-1+ stanice. Supresijski učinak decidualnih limfocita nije se, međutim, bitno promijenio nakon in vitro izvršene deplecije CD3+ stanica (neobjavljeni

podaci). Drugim riječima, NKH-1+ CD2+ CD3- decidualni granulirani limfociti odgovorni su za imunosupresijski učinak koji smo opazili u testovima blastične transformacije u normalnim trudnoćama i trudnoćama blighted ovum. Kad je riječ o imunosupresiji na razini decidue, i drugi autori (22, 36, 60, 127, 195, 248) pridaju spomenutoj subpopulaciji decidualnih limfocita veliki značaj.

Izgleda, međutim, da i druge stanice decidue imaju svojstvo imunosupresijskog djelovanja (22, 52, 59). U pokusima u kojima smo stimulirali proliferaciju singeničkih limfocita periferne krvi pomoću poliklonskih mitogena i aloantigena i sami smo opazili imunosupresijski učinak decidualnih adherentnih stanica u skupinama intrauterinih trudnoća s vijabilnim trofoblastom i u skupini izvanmaterničnih trudnoća. Imunosupresijska sposobnost decidualnih makrofaga, koju barem dijelom induciraju lokalni hormoni ili njima slične tvari, posredovana je prostaglandinima, osobito prostaglandinom E<sub>2</sub> (179, 234). Predloženi mehanizmi djelovanja PGE<sub>2</sub> kojima se postiže ili olakšava imunosupresijski učinak su inaktivacija prirodnih stanica ubica (211), blokiranje aktivacije majčinih citotoksičnih T limfocita s potencijalnom antitrofoblastičnom aktivnosti (180) te inhibicija lokalne produkcije IL-2 i ekspresije IL-2 receptora na površini decidualnih T limfocita (29, 135). Decidualni makrofagi mogli bi, kao stanice koje prezentiraju strane antigene, biti važni i kao induktori lokalne supresije (177, 178). Dokaze da je PGE<sub>2</sub> glavni medijator supresije od strane makrofaga nalazimo u pokusima u kojima je nedvojbeno pokazano da dodatak indometacina koji je inhibitor sinteze prostaglandina ili anti PGE<sub>2</sub> antitijela u kulturu stanica poništava supresijski učinak makrofaga (179), oživljava aktivnost NK stanica decidue (211) i uzrokuje visok postotak spontanijih resorpcija trudnoća u miševa (135). Dodatkom visokih doza čistog PGE<sub>2</sub> u kulturu makrofaga inhibiranih indometacinom ponovno se postiže prijašnji imunosupresijski učinak, a u in vivo pokusima na miševima smanjuje se postotak spontanijih resorpcija trudnoća (135). Uloga makrofaga nije, međutim, u potpunosti jasna budući da ima mišljenja i o štetnom

utjecaju makrofaga na ranu trudnoću (4, 12, 102, 147) i fertilitet općenito (190).

Vrlo je vjerojatno da i druge stanice decidue proizvode imunosupresijske učinke posredstvom solubilnih faktora koje otpuštaju u okolno decidualno tkivo. Kultivacijom tkiva humanog endometrija, Wang i sur. (244) su pokazali da pod utjecajem hormona izlučeni solubilni faktori suprimiraju reakciju pomiješanih limfocita i proliferaciju stanica stimuliranih s PHA. Pritom je supernatant dobiven od sekrecijskog endometrija proizveo jači imunosupresijski učinak nego onaj od endometrija u fazi proliferacije. I drugi autori izvješćuju o supresijskom učinku supernatanta kultiviranih decidualnih stanica rane humane trudnoće (48, 61, 91, 152, 153). Bez obzira na prirodu imunosupresijskih solubilnih faktora u supernatantu kultiviranih decidualnih stanica (48, 59, 61, 62, 119, 153, 234) svi se autori slažu u mišljenju da je supresija izazvana inhibicijom produkcije IL-2 i gama interferona i, vrlo vjerojatno, ometanjem ekspresije IL-2 receptora (62, 152, 221).

Imunosupresijski učinak suspendiranih decidualnih limfocita iz normalnih trudnoća i trudnoća blighted ovum u kulturi singeničkih limfocita periferne krvi koja je stimulirana aloantigenima (limfociti treće osobe), mogao bi tako biti posljedica djelovanja solubilnih faktora koje funkcionalno sposobni decidualni limfociti izlučuju u okolinu.

U preostale tri skupine ispitivanih patoloških trudnoća (missed abortion, izvanmaternične trudnoće, ponavljani spontani pobačaji) nije postojao supresijski učinak decidualnih limfocita na proliferaciju singeničkih limfocita periferne krvi, koju smo stimulirali s PHA i Con-A. Spomenuto opažanje proizašlo je iz rezultata koji su predstavljali prosječne vrijednosti supresije/stimulacije za pojedinu skupinu trudnoća (Tablica 15, Tablica 16, Tablica 17). Učestalost javljanja supresije unutar svake od skupina patoloških trudnoća (22% u skupini trudnoća missed abortion, 25% u skupini izvanmaterničnih trudnoća i 33% u skupini ponavljanih spontanih pobačaja)



bila je značajno niža u odnosu na učestalost supresije u skupinama normalnih trudnoća i trudnoća blighted ovum. I drugi autori iznose slična opažanja (164). Analizirajući isključivo slučajeve sa supresijskim učinkom decidualnih limfocita, opaženi postotak supresije bio je, također, znatno manji nego u normalnim trudnoćama. Spomenuto se odnosi na dva slučaja supresije u skupini trudnoća missed abortion (17% supresije decidualnih limfocita nakon stimulacije s PHA) i na jedan slučaj trudnoće blighted ovum iz skupine ponavljanih spontanih pobačaja (kod stimulacije s PHA supresija je iznosila 13%, a nakon stimulacije s Con-A 12%).

U skupinama trudnoća missed abortion i ponavljani spontani pobačaji nismo dokazali ni postojanje imunosupresijskog učinka decidualnih makrofaga u testovima blastične transformacije nakon stimulacije s PHA i Con-A. Za razliku od decidualnih limfocita u normalnim trudnoćama prvog tromjesečja, limfociti decidue iz trudnoća missed abortion, izvanmaterničnih trudnoća i ponavljanih spontanih pobačaja nisu pokazali imunosupresijski učinak na proliferaciju singeničkih limfocita periferne krvi nakon aloantigenske stimulacije (limfociti treće osobe zakočeni mitomicinom c).

Granulirani limfociti mogu se u malenom broju naći u proliferacijskom endometriju, dok im se u endometriju kasne sekrecijske faze i osobito u decidui prvog tromjesečja broj znatno povećava (31, 195). U decidui rane trudnoće nema pritom populacije stanica koja ne postoji i u endometriju izvan trudnoće (22). Spomenuta opažanja i rezultati studije u kojoj smo pomoću imunohistološke pretrage i metode protočne citometrije ispitivali brojčanu zastupljenost granuliranih limfocita u decidui normalnih trudnoća, trudnoća blighted ovum, missed abortion i izvanmaterničnih trudnoća ukazuju na indukcijski utjecaj trofoblasta na prisustvo decidualnih granuliranih limfocita u prvom tromjesečju humane trudnoće. Iako ove stanice nose marker leukocita (CD45) koji su porijeklom iz koštane srži (29, 36, 222), zasad se ne može dokazati njihov neposredni prijelaz iz periferne krvi. K tome, antigenski fenotip DGL (NKH-1+ CD2+ CD3- CD16-) vrlo je sličan tek maloj subpopulaciji od svega 2% NK stanica periferne krvi (136).

U nekih životinjskih vrsta izgleda da je za regrutaciju NK stanica u deciduu neophodan embrio (58). Kad je riječ o humanoj trudnoći, na upravo suprotan zaključak navode nas naši rezultati, budući da smo u deciduama iz normalnih trudnoća, trudnoća blighted ovum (vijabilni trofoblast) i trudnoća missed abortion (embrio u nekrozi i resorpciji, a trofoblast naknadno propada) našli gotovo identičnu zastupljenost decidualnih granuliranih limfocita. U decidui izvanmaterničnih trudnoća, u kojima se ne ostvaruje neposredni kontakt decidue i embriotrofoblasta, imali smo znatno manji broj DGL, pa je to bio dokaz više o značaju trofoblasta za mobilizaciju granuliranih limfocita u deciduu. S druge strane, funkcionalne razlike između endometrija izvan trudnoće (engl. nonpregnant endometrium) i decidue prvog tromjesečja mogle bi biti posljedica aktivacije specifičnih staničnih funkcija zbog prisustva trofoblasta, prije nego li regrutacije novih staničnih populacija iz periferne krvi (22). Naši rezultati koji se temelje na fenotipizacijskoj i funkcionalnoj studiji decidualnih limfocita u nekoliko skupina različitih vrsta trudnoća idu u prilog spomenutoj tvrdnji, s napomenom da je za specifičnu aktivnost decidualnih limfocita, odnosno leukocita u cjelini, od samog prisustva trofoblasta važnija možda njegova indukcijska/stimulacijska sposobnost. Na spomenuto mišljenje naveo nas je nalaz niskog odnosno potpuno izostalog immunosupresijskog učinka decidualnih limfocita na proliferaciju singeničkih limfocita periferne krvi nakon stimulacije mitogenima i aloantigenima u slučajevima trudnoća missed abortion i ponavljanih spontanih pobačaja. Imunosupresijska aktivnost karakteristična za decidualne granulirane limfocite u normalnoj trudnoći i trudnoći blighted ovum s vijabilnim i stimulacijski sposobnim trofoblastom nije postojala u skupini trudnoća missed abortion, vjerojatno zbog stimulacijski nesposobnog trofoblasta koji je u propadanju. S druge strane, samo prisustvo pa makar i takvog trofoblasta bilo je u početku izgleda dovoljno da osigura zastupljenost DGL (oko 40%) sličnu onoj u normalnim trudnoćama i trudnoćama blighted ovum. Na funkcionalnu povezanost decidue i trofoblasta ukazuju radovi mnogih autora. S jedne strane, trofoblast inducira

imunosupresijsku aktivnost decidue (47, 48, 57, 61, 130, 221), a s druge, decidualni limfociti (6, 246) i NK stanice (56) luče niz limfokina odnosno citokina koji potpomažu rast i proliferaciju trofoblasta u normalnoj trudnoći. Štoviše, i različiti stupnjevi hiperplazije trofoblasta u molarnim trudnoćama pokušavaju se objasniti imunotrofičkom stimulacijom (233), mehanizmom kojeg neki autori pretpostavljaju imunosupresiji kad je riječ o održavanju trofoblasta i trudnoće u cjelini (6, 99). Poznato je, također, da jedan dio živorođene djece od žena koje su prethodno više puta spontano pobacivale pokazuje očito znakove zastoja intrauterinog rasta i da se prethodnom imunizacijom takvih žena može spriječiti spontani pobačaj odnosno zastoj fetalnog rasta (54, 169). Obzirom na opisanu vezu između spontanog pobačaja i zastoja intrauterinog rasta fetusa, faktor rasta poput GM-CSF (engl. granulocyte/macrophage colony stimulating factor) koji stimulira rast trofoblasta, mogao bi biti kompetitivni inhibitor citotoksičnih citokina (166). Funkcionalna povezanost trofoblasta i decidualnih (majčinih) limfocita očituje se i u prisustvu tzv. blokirajućih antitijela koja su u normalnim i molarnim trudnoćama posljedica imunog odgovora majčinog organizma na TLX antigenski sustav trofoblasta (27, 99, 166, 201, 233). Spomenuta, najvjerojatnije, IgG antitijela blokiraju destruktivnu citotoksičnu reakciju majčinih imunokompetentnih stanica prema embrioplacentnoj jedinici. Dokaz je tome odsustvo blokirajućih antitijela u nuligravida i u žena sa spontanim pobačajima (81, 200, 226, 233) i njihovo ponovno javljanje u žena s ponavljanim spontanim pobačajima nakon imunizacije limfocitima (54, 82, 181, 231) ili trofoblastnim stanicama (113).

Izostanak imunosupresijske aktivnosti decidualnih limfocita u testovima blastične transformacije i reakcijama pomiješanih limfocita u skupini izvanmaterničnih trudnoća mogao bi se objasniti odsustvom trofoblasta unutar maternice koji zato nije u mogućnosti inducirati imunosupresijske mehanizme u decidui. Značajno veći udio CD4+ stanica u odnosu na njihovu zastupljenost u decidui normalnih trudnoća mogao bi, slično hipersenzitivnoj reakciji u implantacijskom mjestu molarno promijenjene

posteljice (116), biti odgovoran za vaskularne poremećaje u decidui koji dovode do ishemije i nekroze s posljedičnim krvarenjem i odbacivanjem nekrotične decidue iz maternice.

Slučajevi trudnoća missed abortion nalikuju imunološkoj reakciji odbacivanja kalema od strane domaćina (22, 45, 166). Mi smo u skupini trudnoća missed abortion i ponavljanih spontanih pobačaja dokazali izostanak imunosupresijskog učinka decidualnih limfocita na proliferaciju singeničkih limfocita periferne krvi nakon stimulacije mitogenima i aloantigenima. Dobiveni rezultati i rezultati drugih autora (59) potkrepljuju pretpostavku o imunološkoj etiologiji dijela spontanih pobačaja u slučajevima rane embrionalne smrti (prvo tromjesečje trudnoće). Slično je opaženo u slučajevima spontanih resorpcija oplodjenog jajašca u miševa (45, 52).

Budući da smo u trudnoćama blighted ovum u kojima se embrio uopće ne razvija dokazali imunosupresiju identičnu onoj u normalnim trudnoćama, izgleda da se izostanak supresije u trudnoćama missed abortion ne može objasniti smrću embrija već poremećajima u trofoblastu koji dovode do njegove propasti (166, 233). Najvažniji klinički marker kojim se može predskazati propadanje trofoblastnog tkiva je humani horiogonadotropin (hCG) (166). Od svih imunosupresijskih tvari koje luči sinciotrofoblast (17, 71, 149, 209), hCG je najvažniji i najosjetljiviji klinički marker kojim se može procijeniti funkcionalno stanje trofoblasta (166). U pokusima hCG suprimira NK lizu stanične linije K562 (228). Pad koncentracije beta-hCG u serumu trudnice može ponekad prethoditi spontanom pobačaju i do dva tjedna. Izgleda da pad produkcije beta-hCG u sinciotrofoblastu nije posljedica djelovanja anti-hCG antitijela, budući da se osjetljivom radioimunološkom pretragom ona nisu mogla dokazati ni u žena u kojih su sve niže aktivnosti beta-hCG u serumu prethodile spontanom pobačaju (166, 233). Još uvijek nije jasna uzročno - posljedična veza između propasti trofoblasta i pada koncentracije beta-hCG. Ima mišljenja, naime, prema kojima biokemijsko - molekularni poremećaji u sinciotrofoblastu dovode do smrti stanica trofoblasta i tako uzrokuju smanjeno stvaranje i

izlučivanje beta-hCG u okolna tkiva (166). Prema drugoj hipotezi koja se temelji na inhibiciji otpuštanja beta- hCG iz humanog trofoblasta od strane decidualnih proteinskih tvari (193), niska aktivnost i gustoća beta-hCG na površini sinciciotrofoblasta mogla bi učiniti spomenuti trofoblast osjetljivijim na lizu posredovanu NK i LAK stanicama majčine decidue (113, 125, 228).

Iako nema sumnje u postojanje uzročne veze između neživog trofoblasta i izostanka lokalne decidualne imunosupresije, ostaje otvoreno pitanje koji je od spomenutih poremećaja uzrok a koji posljedica. Osim smanjene ili potpuno odsutne lokalne imunosupresije, u slučajevima spontanih resorpcija trudnoće u miševa i spontanih pobačaja u ljudi dokazana je i povećana citotoksična i citolitička aktivnost decidualnih leukocita (citotoksični T limfociti, LAK stanice, NK stanice, makrofagi) prema embriotrofoblastnoj jedinici (22, 45, 99, 102, 166, 172). Tako su Gendron i sur. (84) pokazali da učestalost ekstenzivne infiltracije fetoplacentne jedinice u miša NK stanicama četiri dana prije resorpcije odgovara upravo stopi posljedičnih spontanih resorpcija trudnoće. Imunizirajući prethodno CBA ženke miševa sa splenocitima BALB/C soja miševa uspjeli su isti autori u sljedećim trudnoćama prevenirati infiltraciju trofoblasta i embrija NK stanicama i smanjiti stopu spontanih resorpcija na normalne vrijednosti. Spomenuti rezultati ukazuju na izuzetan značaj maternalnih NK stanica, odnosno općenito imunoloških faktora, u etiologiji spontanih pobačaja, osobito rane embrionalne smrti (engl. early embryonic loss, first trimester missed abortion).

Jedino su u skupini trudnoća missed abortion decidualni makrofagi u odnosu na decidualne limfocite pokazali jaču spontanu proliferaciju. To bi se moglo dovesti u vezu s pojačanom aktivacijom decidualnih makrofaga u slučajevima rane smrti embrija, za razliku od normalnih trudnoća gdje je njihova aktivacija suprimirana (99). U nekih žena makrofage mogu aktivirati trofoblastni i/ili spermalni antigeni, ali aktivaciju makrofaga mogu izazvati bakterijske i virusne infekcije (99). I mi smo pokazali da aktivacija supresijske aktivnosti makrofaga nije neposredno ovisna o prisustvu trofoblasta, budući

da smo je dokazali kod decidualnih makrofaga u izvanmaterničnim trudnoćama. Aktivirani makrofagi izlučuju monokine poput TNF (engl. tumor necrosis factor) koji može inhibirati rast embrija i trofoblasta (12, 102, 147) i IL- 1 (119) koji može stimulirati produkciju IL-2 i učiniti fetoplacentnu jedinicu osjetljivom na lizu posredovanu NK stanicama (84, 98). Interleukin-2 čije je djelovanje u normalnoj trudnoći inhibirano (47, 62, 99, 221), mogao bi, oslobođen inhibicije, pojačati NK staničnu aktivnost (80, 135, 184) i stimulirati mononuklearne stanice na stvaranje limfokina, npr. gama-IFN (110). Štoviše, dodatkom IL-2 može se i u čistoj kulturi velikih granuliranih limfocita već nakon jednog sata dokazati izlučeni gama-IFN (256). Tako bi dovoljan broj granuliranih limfocita u decidui trudnoća missed abortion prvog tromjesečja, osobito uz prisustvo aktiviranih makrofaga, mogao proizvesti dovoljno gama-IFN za indukciju ekspresije HLA antigena klase I na trofoblastu i time omogućiti započinjanje klasične citotoksične imunološke reakcije posredovane T limfocitima (79, 223, 233). Isti limfokin čije je prisustvo dokazano u trofoblastnom i decidualnom tkivu intrauterinih i izvanmaterničnih trudnoća (32), može podržavati aktivaciju makrofaga (210) i dodatno pojačati NK staničnu lizu embrioplacentne jedinice (236). Nastao bi začarani krug koji bi tako mogao dovesti do smrti, nekroze i resorpcije embrija i trofoblasta s posljedičnim spontanom pobačajem. Opisana teorija prema kojoj bi solubilni produkti aktiviranih imunokompetentnih stanica inducirali "imunodistrofizam" (99) još je nepotpuno provjerena, ali nudi potencijalno novi mehanizam nastanka imunološki uzrokovanog spontanog pobačaja. Potrebne su dobro planirane i nadzirane kliničke studije da bi se odredila vrijednost spomenute teorije (3).

Imunološka tolerancija i opstanak embrija u, za njega, antigenski nepoznatom okruženju majčinog organizma ostaju i nadalje nepotpuno apsolviran predmet znanstvenog izučavanja. Posebno zanimanje pobuđuju imunološki odnosi između majčinog organizma i embrioplacentne jedinice na lokalnoj razini. Proučavajući fenotipske karakteristike i raspodjelu leukocitnih i, osobito, limfocitnih subpopulacija u bazalnoj i parijetalnoj decidui te njihovo

funkcionalno djelovanje u humanim normalnim i patološkim trudnoćama prvog tromjesečja ukazali smo na značaj lokalnih imunosupresijskih mehanizama za održavanje trudnoće. Osobitu ulogu, kako smo se uvjerali, imali su u tom brojni decidualni granulirani limfociti i decidualni makrofagi. Naša studija ukazala je na izuzetnu važnost stimulacijski sposobnog trofoblasta za indukciju decidualnih imunoloških mehanizama zaštite embrija/fetusa. Opisali smo i potencijalne načine nastanka i razvoja imunološke reakcije odbacivanja ploda, koja se vjerojatno odvija u slučajevima rane smrti embrija (engl. first trimester missed abortion).

Iako je pozornost mnogih znanstvenika usredotočena na lokalne stanične imunološke reakcije, sve pojedinosti oko djelovanja imunoregulacijskih staničnih mehanizama horiodecidualnog spoja nisu, međutim, još uvijek dovoljno poznate. Proučavanje decidualnih leukocitnih subpopulacija i njihovih funkcija u normalnim i patološkim trudnoćama prvog tromjesečja nudi nov i koristan pristup u istraživačkim projektima iz područja imunologije humane reprodukcije. S novim saznanjima možda ćemo jednom biti u prilici in vivo manipulirati mehanizmima imunoregulacije koji očigledno postoje, i tako prevenirati spontano odbacivanje živog i zdravog ploda iz majčinog organizma.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Citogenetskom analizom stanica spontano pobačenih produkata oplodnje ustanovili smo visok postotak kromosomskih aberacija u trudnoćama blighted ovum (60%). U trudnoćama missed abortion postotak kromosomopatija, iako relativno manji (<20%), još uvijek je znatno veći nego u normalnim trudnoćama. Rezultati opravdavaju potrebu razlikovanja pojedinih morfoloških entiteta u inače heterogenoj skupini spontanih pobačaja te njihovu citogenetsku obradu.

2. Biopsija decidualnog tkiva pod kontrolom ultrazvuka pokazala se jednostavnom i sigurnom metodom za dobivanje uzoraka za imunohistološku pretragu. Uz dobru pripremu bioptičkog materijala, imunohistološka pretraga daje objektivan prikaz sastava imunokompetentnih stanica u analiziranim uzorcima decidualnog tkiva. Uzorci, međutim, ne moraju biti i reprezentativni.

3. Enzimatska metoda obrade decidualnog tkiva (0,125% Trypsin) omogućava dobivanje reprezentativnog uzorka decidualnih leukocita u suspenziji (zastupljenost leukocita >75%, vijabilnost >90%) za njihovu daljnju fenotipizaciju i funkcionalna ispitivanja.

4. Između bazalne i parijetalne decidue ne postoje bitnije razlike u broju i rasporedu leukocitnih subpopulacija. To se osobito odnosi na ispitivane decidualne makrofage, CD2+, CD4+, CD8+, CD3+, NKH-1+ i gamma/delta TCR+ decidualne stanice te B limfocite.

5. Decidualne makrofage kao dominantnu staničnu subpopulaciju decidualnih leukocita u bazalnoj i parijetalnoj decidui slijede po zastupljenosti NKH-1+ i CD2+ stanice. Navedeno vrijedi kako za normalne tako i za ispitivane patološke trudnoće prvog tromjesečja. Stanice CD3+ i, osobito B limfociti i gamma/delta TCR+ stanice, samo se rijetko pojavljuju u decidui ranih humanih trudnoća.



6. U uzorcima decidualnog tkiva dobivenih biopsijom ukupan broj CD4+ i CD8+ stanica uveliko nadmašuje broj CD3+ stanica, što govori u prilog činjenici da i druge vrste decidualnih stanica eksprimiraju spomenute antigene. Rezultati analize decidualnih limfocitnih suspenzija protočnom citometrijom potvrđuju prethodnu konstataciju, budući da su u spomenutim limfocitnim suspenzijama (bez adherentnih stanica) CD4+ i CD8+ limfociti bili ukupno tek neznatno brojniji od CD3+ limfocita.

7. Sastav i odnosi među leukocitnim subpopulacijama u perifernoj krvi trudnica nije ovisio o vrsti ispitivane rane humane trudnoće. Najbrojniji su bili CD2+ limfociti, a slijedile su po zastupljenosti CD3+, CD4+, CD8+, HLA-DR+ i CD11-c+ stanice. Shodno tome, omjeri stanica CD4+/CD8+ i CD4+/CD11-c+ bili su u korist CD4+ stanica. Ukupan broj stanica s CD4 i CD8 površinskim antigeonom odgovarao je udjelu CD3+ stanica u perifernoj krvi trudnica.

8. Izgleda da osim NKH-1 (CD56) antigena decidualni granulirani limfociti mogu eksprimirati i CD11-c antigen. To smo pokazali metodom jednostrukog i dvostrukog obilježavanja površinskih staničnih antigena u protočnom citometru.

9. Potpuna inverzija omjera stanica CD4+/CD8+, CD4+/CD11-c+ i CD4+/HLA-DR+ u decidui intrauterinih trudnoća prvog tromjesečja u odnosu na omjere spomenutih stanica u perifernoj krvi trudnica, nastaje, s jedne strane zbog smanjenja broja CD3+ CD4+ stanica, a s druge zbog povećanja broja CD11-c+, vjerojatno pod neposrednim utjecajem trofoblastnih/fetalnih antigena. Udio CD8+ stanica nije pokazivao bitnijih promjena, osim što postoji mogućnost kvantitativne preraspodjele unutar navedene skupine stanica (supresijske : citotoksičke T stanice).

10. Na smanjenje broja CD3+ CD4+ stanica, odnosno na povećanje broja CD11-c+ stanica u ranoj decidui utječu i lokalni humoralni faktori. Na to upućuje inverzija omjera CD4+/CD11-c+ stanica, te podjednak broj CD4+

i CD8+ stanica u decidui izvanmaterničnih trudnoća gdje se deciduohorijalni spoj neposredno ne ostvaruje.

11. U decidui normalnih i patoloških intrauterinih trudnoća prvog tromjesečja, udio granuliranih limfocita (NKH-1+ CD11-c+ CD2+ CD3- stanice) bio je podjednako visok, a njihov značajno niži postotak u perifernoj krvi trudnica i decidui izvanmaterničnih trudnoća dodatno potvrđuje značajnu ulogu trofoblasta u njihovoj mobilizaciji/proliferaciji u decidualnom tkivu.

12. Iako je spontana proliferacija decidualnih limfocita (neadherentna frakcija stanica) i decidualnih makrofaga (adherentna frakcija stanica) intenzivnija od spontane aktivnosti singeničkih limfocita periferne krvi, decidualni limfociti i decidualni makrofagi pokazuju znatno slabiji proliferacijski odgovor nakon stimulacije poliklonskim mitogenima (PHA i Con-A) i aloantigenima u odnosu na limfocite periferne krvi u svim skupinama ispitivanih trudnoća prvog tromjesečja.

13. U normalnim i anembrionskim trudnoćama (blighted ova) prvog tromjesečja decidualni limfociti i decidualni makrofagi proizveli su podjednako snažan supresijski učinak na proliferaciju singeničkih limfocita periferne krvi u kulturi stimuliranoj s PHA. To je ujedno i dokaz da imunosupresijska aktivnost decidualnih leukocita nije ovisna o prisustvu embrija već je dostatan vijabilni i stimulacijski sposoban trofoblast.

14. U skupini ranih humanih trudnoća missed abortion, u skupini ponavljanih spontanih pobačaja i u skupini izvanmaterničnih trudnoća izostao je imunosupresijski učinak decidualnih limfocita na proliferaciju singeničkih limfocita periferne krvi u kulturi stimuliranoj s PHA i aloantigenima. U slučajevima rane smrti ploda, to se dovodi u uzročno - posljedičnu vezu s odumiranjem i nekrozom trofoblastnog tkiva, ne prejudicirajući koji su od spomenutih poremećaja primarni, a koji sekundarni. Kad je riječ o izvanmaterničnim trudnoćama, izgleda da je presudno odsustvo neposrednog kontakta između trofoblasta i decidue.

15. Decidualni makrofagi proizveli su u testu blastične transformacije podjednako velik imunosupresijski učinak na proliferaciju singeničkih limfocita periferne krvi u skupini normalnih, anembrionskih i izvanmaterničnih trudnoća, što ukazuje na značajnu ulogu trofoblasta i lokalnih solubilnih tvari u indukciji supresijske aktivnosti decidualnih adherentnih stanica.

## 6. LITERATURA

1. AHRONS S 1971 Leukocyte antibodies: Occurrence in primagravidae. *Tissue Antigens* 1:179.
2. AMOS DB i KOSTYN DD 1980 HLA-A control immunological agency of man. *Adv Hum Genet* 10:137-141.
3. ANDERSON DJ i HILL JA 1987 Criteria for the use of lymphokines and monokines in reproductive test systems. *Fertil Steril* 48:894-895.
4. ANDERSON DJ i HILL JA 1988 Cell-mediated immunity in infertility. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 17:22-30.
5. ANTCZAK DF 1989 Maternal antibody responses in pregnancy. *Curr Opin Immunol* 1:1135-1140.
6. ATHANASSAKIS I, BLEACKLEY RC, PAETKAU V, GUILBERT L, BARR PJ i WEGMANN TG 1987 The immunostimulatory effect of T cells and T cell lymphokines on murine fetally derived placental cells. *J Immunol* 138:37-44.
7. BACH FH i SACHS DH 1987 Current concepts: Immunology. Transplantation immunology. *N Engl J Med* 317:489-492.
8. BALEY JE i SCHACTER BZ 1985 Mechanisms of diminished natural killer cell activity in pregnant women and neonates. *J Immunol* 134:3042-3048.
9. BEER AE i BILLINGHAM RE 1974 Host response to intrauterine tissue, cellular and fetal allografts. *J Reprod Fertil* 21:59- 88.
10. BEER AE i BILLINGHAM RE 1977 Histocompatibility gene polymorphisms and maternal - fetal interactions. *Transplant Proc* 9:1393-1401.
11. BEER AE, QUEBBEMAN JF, AYERS JWI i HAINES RF 1981 Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses and chronic habitual abortions in humans. *Am J Obstet Gynecol* 141:987-999.

12. BERKOWITZ RS, HILL JA, KURTZ CB i ANDERSON DJ 1988 Effects of products of activated leukocytes (lymphokines and monokines) on the growth of malignant trophoblast cells in vitro. Am J Obstet Gynecol 158:199-203.

13. BERKOWITZ RS, UMPIERRE SA, GOLDSTEIN DP i ANDERSON DJ 1988 Cross - reactivity of monoclonal antibodies directed against lymphocyte markers with trophoblast cells of normal placenta, hydatidiform mole, and gestational choriocarcinoma. Gynecol Oncol 29:94-100.

14. BEVAN DJ i CHISOLM PW 1986 Co - expression of CD4 and CD8 molecules and de novo expression of MHC class II antigens on activated rat T cells. Immunol 59:621-625.

15. BIDDLE PK, FRIEDMAN CI i JOHNSON PM 1987 Leucocyte reactive antibodies and recurrent early pregnancy failure. Am J Obstet Gynecol 157:785-786.

16. BILLINGHAM RE 1964 Transplantation immunity and the maternal - fetal relation. N Engl J Med 270:667-672.

17. BISCHOP P, DUBERG S, SCHINDLER AM, OBRADOVICI D, WEIL A, FAIGUX R, HERMAN WL i SIZONENKO PC 1982 Endometrial and plasma concentrations of pregnancy - associated plasma protein-A (PAPP-A). Br J Obstet Gynecol 89:701-703.

18. BISHOP PW, MALAM JE, MORRIS JA i FOX H 1987 Distribution of Ca (Oxford) antigen on placental trophoblast. J Pathol 151:119-123.

19. BOUE J, BOUE A i LAZAR P 1975 Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous abortions. Teratology 12:11-26.

20. BRUMSTED JR, NAKAJIMA ST, BADGER G, RIDDICK DH i GIBSON M 1990 Serum concentration of CA-125 during the first trimester of normal and abnormal pregnancies. J Reprod Med 35:499-502.

21. BUCHHOLZ F, DIETL J, HORNY HP i BONATZ G 1989 Immunophenotyping of lymphoreticular cells in the human decidua. Geburtsh Frauenheilk 49:553-556.

22. BULMER JN 1989 Decidual cellular responses. *Curr Opin Immunol* 1:1141-1147.

23. BULMER JN, BILLINGTON WD i JOHNSON PM 1984 Immunohistologic identification of trophoblast populations in early human pregnancy with the use of monoclonal antibodies. *Am J Obstet Gynecol* 148:19-26.

24. BULMER JN, HAGIN SV, BROWNE CM i BILLINGTON WD 1986 Localization of immunoglobulin containing cells in human endometrium, in the first trimester of pregnancy and throughout the menstrual cycle. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 23:31-44.

25. BULMER JN, HOLLINGS S i RITSON A 1987 Immunocytochemical evidence that endometrial stromal granulocytes are granulated lymphocytes. *J Pathol* 153:281-288.

26. BULMER JN i JOHNSON PM 1984 Macrophage population in the human placenta and amniochorion. *Clin Exp Immunol* 57:393- 403.

27. BULMER JN i JOHNSON PM 1985 Antigen expression by trophoblast populations in the human placenta and their possible immunobiological relevance. *Placenta* 6:127-140.

28. BULMER JN i JOHNSON PM 1985 Immunohistological characterization of the decidual leucocytic infiltrate related to endometrial gland epithelium in early human pregnancy. *Immunology* 55:35-44.

29. BULMER JN i JOHNSON PM 1986 The T-lymphocyte population in first - trimester human decidua does not express the interleukin-2 receptor. *Immunology* 58:685-687.

30. BULMER JN, JOHNSON PM, SASAGAWA M i TAKEUCHI S 1988 Immunohistochemical studies of fetal trophoblast and maternal decidua in hydatidiform mole and choriocarcinoma. *Placenta* 9:183-200.

31. BULMER JN, LUNNY DP i HAGIN SV 1988 Immunohistochemical characterization of stromal leucocytes in nonpregnant human endometrium. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 17:83-90.

32. BULMER JN, MORRISON L, JOHNSON PM i MEAGER A 1990 Immunohistochemical localization of interferons in human placental tissues in normal, ectopic, and molar pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 22:109-116.

33. BULMER JN, MORRISON L i SMITH JC 1988 Expression of class II MHC gene products by macrophages in human uteroplacental tissue. *immunology* 6:707-714.

34. BULMER JN, PACE D i RITSON A 1988 Immunoregulatory cells in human decidua: morphology, immunohistochemistry and function. *Reprod Nutr Develop* 28:1599-1614.

35. BULMER JN, SMITH J, MORRISON L i WELLS M 1988 Maternal and fetal cellular relationships in the human placental basal plate. *Placenta* 9:237-246.

36. BULMER JN i SUNDERLAND CA 1984 Immunohistological characterization of lymphoid cell populations in the early human placental bed. *Immunology* 52:349-357.

37. CAUCHI MN, TAIT B, WILSHIRE MI, KOH SH, MRAZ G, KLOSS M i PEPPERELL R 1988 Histocompatibility antigens and habitual abortion. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 18:28-31.

38. CERF-BENSUSSAN M, GUY-GRAND D i GRISCELLI C 1985 Intraepithelial lymphocytes of human gut: isolation, characterization and study of natural killer activity. *Gut* 26:81-88.

39. CHAOUAT G 1988 Immunoregulatory placental function in normal and pathological pregnancies. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 17:18-21.

40. CHAOUAT G i KOLB JP 1985 Immunoreactive products of placenta. IV Impairment by placental cells and their products of CTL function at effector stage. *J Immunol* 135:215-222.

41. CHAOUAT G, MENU E, BONNETON C i KINSKY R 1989 Immunological manipulations in animal pregnancy and model of pregnancy failure. *Curr Opin Immunol* 1:1153-1156.

42. CHAOUAT G, MENU E, SADELAIN M, ATHANASSAKIS I i WEGMAN TG 1988 Placental immunotrophism: maternal T cells contribute to

the growth and survival at the fetal allograft. *Am J Reprod Immunol* 16:70-71.

43. CHOUAIB S, WELTE K i MERTELSMMAN R 1985 Prostaglandin E acts at two distinct pathways of T lymphocytes activation: Inhibition of interleukin production and down-regulation of transferin receptor expression. *J Immunol* 135:1172-1175.

44. CLAMAN HN 1987 The biology of the immune response. *JAMA* 258:2834-2840.

45. CLARK DA, BANWATT DK, MANUEL J, FULOP G i CROY BA 1989 Scid Mice in Reproductive biology. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 152:227-234.

46. CLARK DA, CHAPUT A i TUTTON D 1986 Active suppression of host-vs-graft reaction in pregnant mice. VII. Spontaneous abortion of allogeneic CBA/J x DBA/2 fetuses in the uterus of CBA/J mice correlates with deficient non-T suppressor cell activity. *J Immunol* 136:1668-1675.

47. CLARK DA, FALBO M, ROWLEY RB, BANWATT B i STEDRONSKA-CLARK J 1988 Active suppression of host-vs-graft reaction in pregnant mice. IX. Soluble suppression activity obtained from allopregnant mouse decidua that blocks the cytolytic effector response to IL-2 is related to transforming growth factor- beta. *J Immunol* 141:3833-3840.

48. CLARK DA, FLANDERS KC, BANWATT D, MILLAR-BOOK W, MANUEL J, STEDRONSKA-CLARK J i ROWLEY B 1990 Murine pregnancy decidua produces a unique immunosuppressive molecule related to transforming growth factor beta-2. *J Immunol* 144:3008-3014.

49. CLARK DA i McDERMOTT MR 1978 Impairment of host-vs-graft reaction in pregnant mice. I. Suppression of cytotoxic T cell generation in lymph nodes draining the uterus. *J Immunol* 121:1389-1393.

50. CLARK DA i McDERMOT MR 1981 Active suppression of host-vs-graft reaction in pregnant mice. III. Developmental kinetics, properties and mechanism of induction of suppressor cells during first pregnancy. *J Immunol* 127:1267-1273.



51. CLARK DA, MOWBRAY J, UNDERWOOD J i LIDELL H 1987 Histopathologic alterations in the decidua in human spontaneous abortion: loss of cells with large cytoplasmic granules. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 13:19-22.

52. CLARK DA, SLAPSYS R, CROY BA, KRCEK J i ROSSANT J 1984 Local active suppression by suppressor cells in the decidua: a review. *Am J Reprod Immunol* 5:78-83.

53. CORSAN GH i KEMMANN E 1990 Risk of a second consecutive first-trimester spontaneous abortion in women who conceive with menotropins. *Fertil Steril* 53:817-821.

54. COWCHOCK FS, SMITH JB, DAVID S, SCHER J, BATZER F i CORSON S 1990 Paternal mononuclear cell immunization therapy for repeated miscarriage: predictive variables for pregnancy success. *Am J Reprod Immunol* 22:12-17.

55. CRAINIE M i STIMSON WH 1987 A new human trophoblast antigen isolated from immune complexes derived from placental blood and membranes. *J Clin Lab Immunol* 23:63-69.

56. CROY BA, GAMBEL P, ROSSANT J i WEGMANN TG 1985 Characterization of murine decidual natural killer (NK) cells and their relevance to the success of pregnancy. *Cell Immunol* 93:315-326.

57. CROY BA, ROSSANT J i CLARK DA 1982 Histologic and immunologic studies of post-implantation death of *Mus caroli* embryos in the *Mus musculus* uterus. *J Reprod Immunol* 4:277-293.

58. CROY BA, WATERFIELD A, WOOD W i KING GJ 1988 Normal murine and porcine embryos recruit NK cells to the uterus. *Cell Immunol* 115:471-480.

59. DAYA S, CLARK DA, DEVLIN C i JARRELL J 1985 Preliminary characterization of two types of suppressor cells in the human uterus. *Fertil Steril* 44:778-785.

60. DAYA S, CLARK DA, DEVLIN C, JARRELL J i CHAPUT A 1985 Suppressor cells in human decidua. *Am J Obstet Gynecol* 151:267-270.

61. DAYA S, JOHNSON PM i CLARK DA 1989 Trophoblast induction of suppressor-type cell activity in human endometrial tissue. *Am J Reprod Immunol* 19:65-72.

62. DAYA S, ROSENTHAL KL i CLARK DA 1987 Immunosuppressor factor(s) produced by decidua-associated suppressor cells: a proposed mechanism for fetal allograft survival. *Am J Obstet Gynecol* 156:344-350.

63. DE WOLF, DE WOLF-PEETERS C, BROSENS I i ROBERTSON WB 1980 The human placental bed: electron microscopic study of trophoblastic invasion of spiral arteries. *Am J Obstet Gynecol* 137:568-70.

64. DIMITRIU-BONA A, BURMESTER GR, WATERS SJ i WINCHESTER RJ 1983 Human mononuclear phagocyte differentiation antigens. I. Patterns of antigenic expression on the surface of human monocytes and macrophages defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* 130:145-52.

65. DINARELLO CA i MIER JW 1987 Lymphokines. *N Engl J Med* 317:940-945.

66. DOMKE N, BEUTNER M i HEINRICH K 1988 Diagnostische Schwierigkeiten bei immunologisch bedingter Infertilitat. *Zbl Gynak* 110:715-717.

67. DOMKE N, HEINRICH K i CONRAD K 1988 Immunologische Aspekte von habitueller Abortneigung und intrauterinem Fruchttod. *Zbl Gynak* 110:653-659.

68. DORMAN PJ i SEARLE RF 1988 Alloantigen presenting capacity of human decidual tissue. *J Reprod Immunol* 13:101-112.

69. DOUGLAS GC i KING BF 1990 Uptake and processing of I-labelled transferrin and Fe-labelled transferrin by isolated human trophoblast cells. *Placenta* 11:41-57.

70. DRAKE BL i HEAD JR 1989 Murine trophoblast can be killed by lymphokine-activated killer cells. *J Immunol* 143:9- 14.

71. DUC HT, RIGHENZI S, MANNOT P, NAKAGAWA S i VOISIN GA 1987 In vitro immunomodulatory effects of placental substances on preparatory MLR and resulting modification of lymphocyte reactivities. *J Reprod Immunol* 11:221-235.

72. EARL U, WELLS M i BULMER JN 1986 Immunohistochemical characterization of trophoblast antigens and secretory products in ectopic tubal pregnancy. *Int J Gynecol Pathol* 5:132-142.

73. EDITORIAL 1983 Maternal blocking antibodies, the fetal allograft, and recurrent abortion . *Lancet* 1175-1176.

74. EDWARDS R, CROW J, DALE S, MACNAMEE M, HARTSHORNE G i BRINSDEN P 1990 Preimplantation diagnosis and recurrent hydatidiform mole. *Lancet* 335:1030-1031.

75. EIBEN B, BORGMANN S, SCHUBBE I i HANSMANN I 1987 A cytogenetic study directly from chorionic villi of 140 spontaneous abortions. *Hum Genet* 77:137-141.

76. FAULK WP, TEMPLE A, LOVINS RE i SMITH N 1978 Antigens of human trophoblasts: a working hypothesis for their role in normal and abnormal pregnancies. *Immunology* 75:1947-1951.

77. FAULK WP, YEAGER C, McINTYRE JA i UEDA M 1979 Oncofoetal antigens of human trophoblast. *Proc R Soc Lond* 206:163-182.

78. FAVIER R, EDELMAN P, MARY J-Y i SADOUL G 1990 Presence of elevated serum interleukin-2 levels in pregnant women. *N Engl J Med* 322:270.

79. FEINMAN MA, KLIMAN HJ i MAIN EK 1987 HLA antigen expression and induction by gamma-interferon in cultured human trophoblasts. *Am J Obstet Gynecol* 157:1429-1434.

80. FERRY BL, STARKEY PM, SARGENT IL, WATT GM, JACKSON M i REDMAN CW 1990 Cell populations in the human early pregnancy decidua: natural killer activity and response to interleukin-2 of CD56-positive large granular lymphocytes. *Immunology* 70:446-452.

81. FIZET D i BOUSQUET J 1983 Absence of a factor blocking a cellular cytotoxicity reaction in the serum of women with recurrent abortions. *Br J Obstet Gynecol* 90:453-456.

82. FIZET D, BOUZGARROU R i VEZON G 1990 Lymphocyte immunization generates immunosuppressive factors in women with recurrent abortions. *Gynecol Obstet Invest* 30:8-11.

83. GAMBEL P, ROSSANT J i HUNSIKER RD 1985 Origin of decidual cells in murine pregnancy and pseudopregnancy. *Transplantation* 39:443-445.
84. GENDRON RL i BAINES MG 1988 Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice. *Cell Immunol* 113:261-267.
85. GILL TJ III 1983 Immunogenetics of spontaneous abortions in humans. *Transplantation* 35:1-6.
86. GILL TJ III 1986 Immunological and genetic factors influencing pregnancy and development. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 10:116-120.
87. GILL TJ III 1987 Genetic factors in foetal loss. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 15:133-137.
88. GILL TJ III i REPETTI CF 1979 Immunological and genetic factors influencing reproduction. *Am J Pathol* 95:463-570.
89. GLEICHER N i EL-ROEIY A 1988 The reproductive autoimmune failure syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 159:223-227.
90. GLEICHER N, EL-ROEIY A, CONFINO E i FRIBERG J 1989 Reproductive failure because of antibodies: unexplained infertility and pregnancy wastage. *Am J Obstet Gynecol* 160:1376-1385.
91. GOLANDER A, ZAKUTH V, SHECHTER Y i SPIRER Z 1981 Suppression of lymphocytes reactivity in vitro by a soluble factor secreted by explants of human decidua. *Eur J Immunol* 11:849-851.
92. GRABOWSKA A, CHUMBLEY G, CARTER N i LOKE YW 1990 Interferon-gamma enhances mRNA and surface expression of class I antigen on human extravillous trophoblast. *Placenta* 11:301-308.
93. HAAS GG, KUBOTA K, QUEBBEMAN JF, JIJON A, MENGE AC i BEER AE 1986 Circulating antisperm antibodies in recurrently aborting women. *Fertil Steril* 45:209-215.
94. HAMPERL H i HELLWEG G 1958 Granular endometrial stromal cells. *Obstet Gynecol* 2:379-387.

95. HARGER JH, RABIN BS i MARCHESE SG 1989 The prognostic value of antinuclear antibodies in women with recurrent pregnancy losses: a prospective controlled study. *Obstet Gynecol* 73:419-424.

96. HARKNESS RA 1980 Estrogens and host-resistance. *J Royal Soc Med* 73:161-164.

97. HERCEND T i SCHMIDT RE 1988 Characteristics and uses of natural killer cells. *Immunol Today* 9:291-295.

98. HERMANN J, DINARRELLO CA, KEN MC i ROBSON AR 1985 The role of interleukin-1 in tumor NK cell interactions: correction of defective NK cell activity in cancer patients by treating cells with IL-1. *J Immunol* 135:2882-2886.

99. HILL JA 1990 Immunological mechanisms of pregnancy maintenance and failure: a critique of theories and therapy. *Am J Reprod Immunol* 22:33-41.

100. HILL JA i ANDERSON DJ 1990 Immunological mechanisms in recurrent spontaneous abortion. *Arch Immunol Ther Exp* 38:111- 119.

101. HILL JA, BARBIERI RB i ANDERSON DJ 1987 Immunosuppressive effects of danazol in vitro. *Fertil Steril* 48:414-418.

102. HILL JA, HAIMOVICI F i ANDERSON DJ 1987 Products of activated lymphocytes and macrophages inhibit mouse embryo development in vitro. *J Immunol* 139:2250-2254.

103. HO H-N, GILL TJ, NSIEH R-P, HSIEH H-J i LEE T-Y 1990 Sharing of human leukocyte antigens in primary and secondary recurrent spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 163:178- 188.

104. HOWARD FD, LEDBETTER JA, WONG J, BIEBER CP, STINSON EB i HERZENBERG LA 1981 A human T lymphocyte differentiation marker defined by monoclonal antibodies that block E-rosette formation. *J Immunol* 126:2117-2122.

105. HSI B-L, YEH C-JG, SAMSON M i FEHLMANN M 1987 Monoclonal antibody GB36 raised against human trophoblast recognizes a novel epithelial antigen. *Placenta* 8:209-217.

106. HUHNS D, HUBAR C i GASTL G 1982 Large granular lymphocytes: morphological studies. *Eur J Immunol* 12:985-988.

107. HUNZIKER RD, GAMBEL P i WEGMANN TG 1984 Placenta as a selective barrier to cellular traffic. *J Immunol* 133:667-671.

108. HUNT JS, ANDREWS GK i WOOD GW 1987 Normal trophoblasts resist induction of class I HLA. *J Immunol* 138:2481-2487.

109. INGERSLEV HJ i INGERSLEV M 1980 Clinical findings in infertile women with circulating antibodies against spermatozoa. *Fertil Steril* 33:514-520.

110. ITOH K, SHIBA K, SHIMIZU Y, SUZUKI R i KUMAGAI K 1985 Generation of activated killer (AK) cells by recombinant interleukin 2 (rIL 2) in collaboration with interferon-gamma (IFN-gamma). *J Immunol* 134:3124-3129.

111. JACOBS IJ, FAY TN, STABILE I, BRIDGES JE, ORAM DH i GRUDZINSKAS JG 1988 The distribution of CA 125 in the reproductive tract of pregnant and non-pregnant women. *Br J Obstet Gynecol* 95:1190-1194.

112. JANEWAY CA 1988 Frontiers of the immune system. *Nature* 333:804-806.

113. JOHNSON PM, CHIA KV, HART CA, GRIFFITH HB i FRANCIS WJA 1988 Trophoblast membrane infusion for unexplained recurrent miscarriage. *Br J Obstet Gynecol* 95:342-347.

114. JOHNSON PM, DRUGAN A, KOPPITCH FC, UHLMANN WR i EVANS MI 1990 Postmortem chorionic villus sampling is a better method for cytogenetic evaluation of early fetal loss than culture of abortus material. *Am J Obstet Gynecol* 163:1505- 1510.

115. JONKER M, LEEUWEN A i VAN ROOD JJ 1977 Inhibition of mixed leukocytes by alloantisera in man. 2. Incidence and characteristics of MLC-inhibiting antisera from multiparous women. *Tissue Antigens* 9:246-258.

116. KABAWAT SE, MOSTOUFI-ZADEH M, BERKOWITZ RS, DRISCOLL SG, GOLDSTEIN DP i BHAN AK 1985 Implantation site in complete molar pregnancy: a study of immunogenetically competent cells with monoclonal antibodies. *Am J Obstet Gynecol* 152:97-99.

117. KABAWAT SE, MOSTOUFI-ZADEH M, DRISCOLL SG i BHAN AK 1985 Implantation site in normal pregnancy. A study with monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 118:76-84.

118. KAMAT BR i ISAACSON OG 1987 The immunocytochemical distribution of leukocytic subpopulations in human endometrium. *Am J Pathol* 127:66-73.

119. KAUMA S, MATT D, STROM S, EIERMAN D i TURNER T 1990 Interleukin-1 beta, human leukocyte antigen HLA-DR alpha, and transforming growth factor-beta expression in endometrium, placenta, and placental membranes. *Am J Obstet Gynecol* 163:1430-1437.

120. KAWAGOE K, AKIYAMA J, KAWAMOTO T, MORISHITA Y i MORI S 1990 Immunohistochemical demonstration of epidermal growth factor (EGF) receptors in normal human placental villi. *Placenta* 11:7-15.

121. KAWATA M, PARNES JR i HERZENBERG LA 1984 Transcriptional control of HLA-A,B,C antigen in human placental cytotrophoblast isolated using trophoblast- and HLA- specific monoclonal antibodies and the fluorescence - activated cell sorter. *J Exp Med* 160:633-651.

122. KELLY JK i FOX H 1979 Local immunological defence system of the human endometrium. *J Reprod Immunol* 1:39-45.

123. KHONG TY, LIDDELL HS i ROBERTSON WB 1987 Defective haemochorial placentation as a cause of miscarriage: a preliminary study. *Br J Obstet Gynecol* 94:649-655.

124. KING A, BIRKBY C i LOKE YW 1989 Early human decidual cells exhibit NK activity against the K 562 cell line but not against first trimester trophoblast. *Cell Immunol* 118:337- 344.

125. KING A, KALRA P i LOKE YW 1990 Human trophoblast cell resistance to decidual NK lysis is due to lack of NK target structure. *Cell Immunol* 127:230-237.

126. KING A i LOKE YW 1990 Human trophoblast and JEG choriocarcinoma cells are sensitive to lysis by IL-2 - stimulated decidual NK cells. *Cell Immunol* 129:435-448.

127. KING A i LOKE YW 1990 Uterine large granular lymphocytes: a possible role in embryonic implantation. *Am J Obstet Gynecol* 162:308-310.

128. KING A, WELLINGS V, GRDNER L i LOKE YW 1989 Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Immunol* 24:195-205.

129. KIRKPATRICK CH 1987 Transplantation immunology. *JAMA* 258:2993-3000.

130. KLIMAN HJ, FEINBERG RF i HAIMOWITZ JE 1990 Human trophoblast - endometrial interactions in an in vitro suspension culture system. *Placenta* 11:349-367.

131. KOHGO Y, NIITSU Y, NISHISATO T, KONDO H, KATO J, TSUSHIMA N, HIRAYAMA M, SASAKI K i URUSHIZAKI I 1988 Immunoreactive transferrin receptor in sera of pregnant women. *Placenta* 9:523-531.

132. KURMAN RJ, MAIN CS i CHEN H-C 1984 Intermediate trophoblast: a distinctive form of trophoblast with specific morphological, biochemical and functional features. *Placenta* 5:349-369.

133. LABARRERE CA 1988 Review article: acute atherosclerosis. A histopathological hallmark of immune aggression? *Placenta* 9:95-108.

134. LABARRERE CA i FAULK WP 1990 MHC class II reactivity of human villous trophoblast in chronic inflammation of unestablished etiology. *Transplantation* 50:812-816.

135. LALA PK, SCODRAS JM, GRAHAM CH, LYSIAK JJ i PARHAR RS 1990 Activation of maternal killer cells in the pregnant uterus with chronic indomethacin therapy, IL-2 therapy, or a combination therapy is associated with embryonic demise. *Cell Immunol* 127:368-381.

136. LANIER LL, LE AM, CIVIN CI, LOKEN MR i PHILLIPS JH 1986 The relationship of CD16 (LEU-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 136:4480-4486.



137. LANIER LL, PHILLIPS JH, HACKETT J, TUTT M i KUMAR V 1986 Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* 137:2735-2739.

138. LAPPLE M 1988 Stress als Erklärungsmodell ftr Spontanaborte (SA) und rezidivierende Spontanaborte (RSA). *Zbl Gynak* 110:325-335.

139. LARSEN B i GALASK RP 1978 Host-parasite interactions during pregnancy. *Obstet Gynecol Survey* 33:297- 318.

140. LAURITSEN JG, KRISTENSEN T i GRUNNET N 1976 Depressed mixed lymphocyte culture reactivity in mothers with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 125:35-39.

141. LAWLER SD i FISHER RA 1987 Genetic studies in hydatidiform mole with clinical correlations. *Placenta* 8:77- 88.

142. LAWLER SD i FISHER RA 1987 Immunogenicity of hydatidiform mole. *Placenta* 8:195-199.

143. LESSIN DL, HUNT JS, KING CR i WOOD GW 1988 Antigen expression by cells near the maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 16:1-7.

144. LOCKSHIN MD 1990 Pregnancy associated with systemic lupus erythematosus. *Seminars in Perinatology* 14:130-138.

145. LOKE YW i BURLAND K 1988 Human trophoblast cells cultured in modified medium and supported by extracellular matrix. *Placenta* 9:173-182.

146. LOKE YW i KING A 1990 Current topic: interferon and human placental development *Placenta* 11:291-299.

147. MALLMANN P, WERNER A i KREBS D 1990 Serum levels of interleukin-2 and tumor necrosis factor-alpha in women with recurrent abortion. *Am J Obstet Gynecol* 163:1367.

148. MARUO T i MOCHIZUKI M 1987 Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptor and myc oncogene product in human placenta: Implication for trophoblast proliferation and differentiation. *Am J Obstet Gynecol* 156:721-727.

149. MASLAR IA, HESS DL, BUCKMASTER JG, LAZUR JJ, STANCZYK FZ i NOVY MJ 1990 Steroid production by early pregnancy human placental villi in culture. *Placenta* 11:277-288.

150. MATEJČIĆ N, RANDIĆ LJ, RUKAVINA B, MASOVČIĆ J, PETROVIĆ O i HALLER H 1991 Decidual sampling in first trimester pregnancy using rigid forceps under ultrasound control. *Acta Fac Med Flum* 16:149-151.

151. MATHUR S, NEFF MR, WILLIAMSON HO, GENCO PV, RUST PF i GLASSMAN AB 1987 Sperm antibodies and human leukocyte antigens in couples with early spontaneous abortions. *Int J Fertil* 32:59-65.

152. MATSUI S, YOSHIMURA N i OKA T 1989 Characterization and analysis of soluble suppressor factor from early human decidual cells. *Transplantation* 47:678-683.

153. MATSUI S, YOSHIMURA N i OKA T 1989 Immunochemical characterization of the suppressor factor from early human decidual cells. *Transplantation* 48:651-654.

154. McINTYRE JA i FAULK WP 1979 Antigens of human trophoblast. *J Exp Med* 149:824-836.

155. McINTYRE JA i FAULK WP 1986 Trophoblast antigens in normal and abnormal human pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 29:976-998.

156. McINTYRE JA, FAULK WP, NICHOLS-JOHNSON VR i TAYLOR CG 1986 Immunologic testing and immunotherapy in recurrent spontaneous abortion. *Obstet Gynecol* 67:169-174.

157. McINTYRE JA, FAULK WP, VERHULST SJ i COLLIVER JA 1983 Human trophoblast-lymphocyte cross-reactive (TLX) antigens define a new alloantigen system. *Science* 222:1135-1137.

158. McLEAN JM i SCOTHORNE RJ 1972 The fate of skin allograft in the rabbit uterus. *J Anat* 112:423-432.

159. MEDAWAR PB 1954 Some immunological problems raised by the evolution of viviparity. *Symp Soc Exp Biol* 7:320-328.

160. MEHTA SR, CONRAD D, SANDLER R, MORGAN J, MONTAGNA R i MAIZEL AC 1985 Purification of human B cell growth factor. *J Immunol* 135:3298-3302.

161. MEHTA AR i SHAHANI SK 1987 Detection of early pregnancy factor-like activity in women with gestational trophoblastic tumors. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 14:67-69.

162. MENGE AC i BEER AE 1985 The significance of human leukocyte antigen profiles in human infertility, recurrent abortion, and pregnancy disorders. *Fertil Steril* 43:693-695.

163. MICHEL MZ, KHONG TY, CLARK DA i BEARD RW 1990 A morphological and immunological study of human placental bed biopsies in miscarriage. *Br J Obstet Gynecol* 97:984-988.

164. MICHEL M, UNDERWOOD JL, CLARK DA, MOWBRAY JF i BEARD RW 1989 Histologic and immunologic study of uterine biopsy tissue of women with incipient abortion. *Am J Obstet Gynecol* 161:409-414.

165. MILLER JF, WILLIAMSON E, GLUE YB, GRUDZINSKAS JG i SYKES A 1980 Fetal loss after implantation. *Lancet* 2:554-556.

166. MOLONEY MD, BULMER JN, SCOTT JS, NEED JA i PATTISON NS 1988 Maternal immune responses and recurrent miscarriage. *Lancet* 45-46.

167. MORRIS H, EDWARDS J, TILTMAN A i EMMS M 1985 Endometrial lymphoid tissue: an immunohistological study. *J Clin Pathol* 38:644-652.

168. MOWBRAY JF 1990 Immunological factors in human abortion. *Res Immunol* 141:207-211.

169. MOWBRAY JF, UNDERWOOD JL, MICHEL M, FORBES PB i BEARD RW 1987 Immunisation with paternal lymphocytes in women with recurrent miscarriage. *Lancet* 2:679-680.

170. MUELLER UW, HAWES CS i JONES WR 1986 Cell surface antigens of human trophoblast: definition of an apparently unique system with a monoclonal antibody. *Immunology* 59:135-138.

171. MURGITA RA, ANDERSSON IC, SHERMAN MS, BENNICH H i WIGZELL H 1978 Effects of human alpha-foetoprotein on human B and T lymphocyte proliferation in vitro. *Clin Exp Immunol* 33:347-356.

172. NEBEL C 1984 Malimplantation: a cause of failure after IVF and ET. *Am J Reprod Immunol* 6:56-57.

173. NOONAN FP, HALLIDAY WJ, MORTON H i CLUNIE GJA 1979 Early pregnancy factor is immunosuppressive. *Nature* 278:649-651.

174. NOSSAL GJV 1987 The basic components of the immune system. *N Engl J Med* 316:1320-1325.

175. OBER C, MARTIN AO i SIMPSON JL 1983 Shared HLA antigens and reproductive performances among Hutterites. *Am J Hum Genet* 35:994-1004.

176. O BRIEN TJ, ENGVALL E, SCHLAERTH JB i MORROW CP 1980 Trophoblastic disease monitoring: evaluation of pregnancy-specific beta<sub>2</sub>-glycoprotein. *Am J Obstet Gynecol* 138:313-320.

177. OKSENBERG JR, MOR-YOSEF S, EZRA Y i BRAUTBAR C 1988 Antigen - presenting cells in human decidual tissue: III. Role for accessory cells in activation of suppressor cells. *Am J Reprod Immunol* 16:151-158.

178. OKSENBERG JR, MOR-YOSEF S, PERSITZ E, SCHENKER Y, MOSER E i BRAUTBAR C 1986 Antigen - presenting cells in human decidual tissue. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 11:82-88.

179. PARHAR RS, KENNEDY TG i LALA PK 1988 Suppression of lymphocyte alloreactivity by early gestational human decidua. I. Characterization of suppressor cells and suppressor molecules. *Cell Immunol* 116:392-410.

180. PARHAR RS, YAGEL S i LALA PK 1989 PGE<sub>2</sub>-mediated immunosuppression by first trimester human decidual cells blocks activation of maternal leukocytes in the decidua with potential anti-trophoblast activity. *Cell Immunol* 120:61-74.

181. PARK MI, EDWIN SS, SCOTT JR i BRANCH DW 1990 Interpretation of blocking activity in maternal serum depends on the equation used for calculation of mixed lymphocyte culture results. *Clin Exp Immunol* 82:363-368.

182. PERSELLIN RH 1977 The effect of pregnancy on rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis* 9:922-929.

183. PETROVIĆ O 1986 Učestalost molarnog graviditeta s osvrtom na patohistološke karakteristike. Magistarski rad.

184. PHILLIPS JH i LANIER LL 1987 Dissection on the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytolysis. *J Exp Med* 164:814-825.

185. PIJNENBORG R, BLAND JM, ROBERTSON WB, DIXON G i BROSENS I 1981 The pattern of interstitial trophoblastic invasion of the myometrium in early human pregnancy. *Placenta* 2:303-315.

186. PIJNENBORG R, DIXON G, ROBERTSON WB i BROSENS I 1980 Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta* 1:3-19.

187. POLAND BJ, MILLER JR, JONES DC i TRIMBLE BK 1977 Reproductive counseling in patients who have had a spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 127:685-691.

188. POWER DA, MASON RJ, STEWART GM, CATTO GRD, MacLEOD AM, STEWART KN i SHEWAN KN 1983 The fetus as an allograft: evidence for protective antibodies to HLA-linked paternal antigens. *Lancet* 2:701-704.

189. PRIDJIAN G i MOAWAD AH 1989 Missed abortion: Still appropriate terminology? *Am J Obstet Gynecol* 161:261-262.

190. RANDIĆ LJ, HALLER H, ŠUŠA M i RUKAVINA D 1990 Cells adherent to copper-bearing intrauterine contraceptive devices determined by monoclonal antibodies. *Contraception* 42:35-42.

191. REDLINE RW i LU CY 1989 Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leukocytes in murine placenta. Implications for maternal-fetal immunological relationship. *Lab Invest* 61:27-36.

192. REGAN L i BRAUDEL PR 1987 Is antipaternal cytotoxic antibody a valid marker in the management of recurrent abortion? *Lancet* 2:1280-1282.

193. REN SG i BRAUNSTEIN GD 1990 The decidua produces a protein that inhibits choriogonadotropin release from human trophoblasts. *Clin Res* 38:298.

194. RISS PA, RADIVOJEVIĆ K i BIEGLMAYER C 1989 Serum progesterone and human chorionic gonadotropin in very early pregnancy:

implications for clinical management. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 32:71-77.

195. RITSON A i BULMER JN 1987 Endometrial granulocytes in human decidua react with a natural-killer (NK) cell marker, NKH1. *Immunology* 62:329-331.

196. RITSON A i BULMER JN 1987 Extraction of leukocytes from human decidua. A comparison of dispersal techniques. *J Immunol Methods* 104:231-236.

197. RITSON A i BULMER JN 1989 Isolation and functional studies of granulated lymphocytes in first trimester human decidua. *Clin Exp Immunol* 77:263-268.

198. ROBERTSON WB, KHONG TY, BROSENS I, DE WOLF F, SHEPPARD BL i BONNAR J 1986 The placental bed biopsy: review from three European centers. *Am J Obstet Gynecol* 155:401-412.

199. ROBERTSON WB i WARNER B 1974 The ultrastructure of the human placental bed. *J Path* 112:203-211.

200. ROCKLIN RE, KITZMILLER JL, CARPENTER CB, GAROVOY MR i DAVID JR 1976 Maternal-fetal relation. Absence of an immunologic blocking factor from the serum of women with chronic abortions. *N Engl J Med* 295:1209-1213.

201. ROCKLIN RE, KITZMILLER JL i GARVOY MR 1982 Maternal-fetal relation. II. Further characterization of an immunologic blocking factor that develops during pregnancy. *Clin Immunol Immunopathol* 22:305-315.

202. RODGER JC 1985 Lack of a requirement for a maternal humoral immune response to establish or maintain successful allogeneic pregnancy. *Transplantation* 40:372-375.

203. ROTE NS, DOSTAL-JOHNSON D i BRANCH DW 1990 Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss: correlation between the activated partial thromboplastin time and antibodies against phosphatidylserine and cardiolipin. *Am J Obstet Gynecol* 163:575-584.

204. RUKAVINA D, MATEJČIĆ N i STAŠIĆ J 1980 Cellular and humoral immunity after intrauterine sensitization in rats. *Period Biol* 82:89-94.

205. SAJI F, KAYAMA M, KAMEDA T, NEGORO T, NAKAMURO K i TANIZAWA O 1987 Effect of soluble factor secreted from cultured human trophoblast cells on in vitro lymphocyte reactions. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 13:121-124.

206. SARGENT IL i REDMAN CWG 1985 Maternal cell-mediated immunity to fetus in human pregnancy. *J Reprod Immunol* 7:95- 104.

207. SARGENT IL, WILKINS T i REDMAN CWG 1988 Maternal immune responses to the fetus in early pregnancy and recurrent miscarriage. *Lancet* 2:1099-1104.

208. SASAGAWA M, OHMOMO Y, KANAZAWA K i TAKEUCHI S 1987 HLA expression by trophoblast of invasive moles. *Placenta* 8:111- 118.

209. SASAGAWA M, YAMAZAKI T, ENDO M, KANAZAWA K i TAKEUCHI S 1987 Immunohistochemical localization of HLA antigens and placental proteins (alpha-hCG, beta-hCG, CTP, hPL, and SP<sub>4</sub>) in villous and extravillous trophoblast in normal human pregnancy: a distinctive pathway of differentiation of extravillous trophoblast. *Placenta* 8:515-528.

210. SCHULTZ RM 1980 Macrophage activation by interferons. *Lymphokine Rep* 1:63-69.

211. SCODRAS JM, PARHAR RS, KENNEDY TG i LALA PK 1990 Prostaglandin - mediated inactivation of natural killer cells in the murine decidua. *Cell Immunol* 127:352-367.

212. SEARLE RF, JOHNSON MH i BILLINGTON WD 1974 Investigation of antigens on the mouse blastocyst. *Transplantation* 18:136-141.

213. SEARLE RF i MATTHEWS CJ 1988 Differential expression of class II major histocompatibility complex and Thy 1.2 antigens on mouse decidua. *Placenta* 9:57-64.

214. SEGARS JH, NIBLACK GD, OSTEEN KG, ROGERS BJ i WENTZ AC 1989 The human blastocyst produces a soluble factor(s) that interferes with lymphocyte proliferation. *Fertil Steril* 52:381-387.

215. SIITERI PK i STITES DP 1982 Immunologic and endocrine interrelationships in pregnancy. *Biol Reprod* 26:1-14.

216. SILOBRČIĆ V i RUKAVINA D 1989 Imunologija u ginekologiji i opstetriciji. U: Kurjak A Ginekologija i perinatologija. A Kurjak i sur. izd. Naprijed, Zagreb, 553- 566.

217. SIMPSON JL 1980 Genes, chromosomes and reproductive failure. Fertil Steril 33:109-113.

218. SLAPSYS RM i CLARK DA 1982 Active suppression of host-vs-graft reaction in pregnant mice. IV Local suppressor cells in decidua and uterine blood. J Reprod Immunol 4:355-364.

219. SLAPSYS RM i CLARK DA 1983 Active suppression of host-vs-graft reaction in pregnant mice. V Kinetics, specificity and in vivo activity of non-T suppressor cells. Am J Reprod Immunol 3:65-71.

220. SLAPSYS RM, RIDHARDS CD i CLARK DA 1986 Active suppression of host-vs-graft reaction in pregnant mice. VIII The uterine decidua-associated suppressor cell is distinct from decidual NK cells. Cell Immunol 99:140-149.

221. SLAPSYS RM, YOUNGLAI E i CLARK DA 1988 A novel suppressor cell develops in uterine decidua in response to fetal trophoblast-type cells. Reg Immunol 1:182-189.

222. STARKEY PM, SARGENT IL i REDMAN CWG 1988 Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. Immunology 65:129-134.

223. STEEG P, MOORE RN, JOHNSON HM i OPPENHEIM JJ 1982 Regulation of murine macrophage in antigen expression by a lymphokine with immune interferon activity. J Exp Med 156:1780-1793.

224. STEWART I i MUKHTAR DDY 1988 The killing of mouse trophoblast cells by granulated metrial gland cells in vitro. Placenta 9:417-425.

225. STEWART AI, THOMSON MAR, CUNNINGHAM C i CATTO GRD 1988 Human placenta - an antibody sponge? Am J Reprod Immunol Microbiol 17:57-60.



226. STIMSON WH, STRACHAN AF i SHEPHERD A 1979 Studies on the maternal immune response to placental antigens: absence of a blocking factor from the blood of abortion-prone women. *Br J Obstet Gynecol* 86:41-45.

227. STRAUBE W, GORETZLEHNER G, LOH M, SCHTTZ M i NEHMZOW M 1987 Zum Nachweis des Frhschwangerschaftsfaktors (early pregnancy factor, EPF) im Serum bei Patientinnen mit fraglicher Schwangerschaft. *Zbl Gynak* 109:968-973.

228. SULKE AN, JONES DB i WOOD PJ 1985 Hormonal modulation of human natural killer cell activity in vitro. *J Reprod Fert* 7:105-110.

229. SWINBURNE LM 1970 Leucocyte antigens and placental sponge. *Lancet* i:692-594.

230. SZULMAN AE i SURTI U 1984 Complete and partial hydatidiform moles: cytogenetic and morphological aspects. *Adv Exp Med Biol* 176:135-146.

231. TAKAKUWA K 1990 Result of immunotherapy on patients with unexplained recurrent abortion - a beneficial treatment for patients with negative blocking antibodies. *Am J Reprod Immunol* 23:37-41.

232. TAKEUCHI S 1984 Immunology in genesis of partial and total hydatidiform mole. *Adv Exp Med Biol* 176:81-110.

233. TAKEUCHI S 1990 Is production of blocking antibodies in successful human pregnancy an epiphenomenon? *Am J Reprod Immunol* 24:108-119.

234. TAWFIK OW, HUNT JS i WOOD GW 1986 Implication of prostaglandin E in soluble factor mediated immune suppression by murine decidual cells. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 12:111-117.

235. TEKELIOGLU-UYSAL M, EDWARDS RG i KISNISC I HA 1975 Ultrastructural relationships between decidua, trophoblast and lymphocytes at the beginning of human pregnancy. *J Reprod Fert* 42:431-438.

236. TIMONEN T, ORTALDO JR i HERBERMAN RB 1982 Analysis by a single cell cytotoxicity assay of natural killer (NK) cell frequencies among

human large granular lymphocytes and of the effects of interferon on their activity. *J Immunol* 128:2514-2521.

237. TRIPLETT DS 1989 Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 20:52-67.

238. TUTTLE SE, O TOOLE RV, O SHAUGHNESSY RW i ZUSPAN FP 1985 Immunohistochemical evaluation of human placental implantation: an initial study. *Am J Obstet Gynecol* 153:239- 244.

239. UNANDER AM, LINDHOLM A i OLDING LB 1985 Blood transfusions generate/increase previously absent/weak blocking antibody in women with habitual abortion. *Fertil Steril* 44:766-770.

240. UNANDER AM i OLDING LB 1983 Habitual abortion: parental sharing of HLA antigens, absence of maternal blocking antibody and suppression of maternal lymphocytes. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 4:1171-1178.

241. UNDERWOOD JL, RUSZKIEWICZ M, BARNDEN KL, BEARD RW, MOWBRAY JF i SANDERSON AR 1985 Does antigenic modulation cause the absence of major histocompatibility complex antigens on the syncytiotrophoblast? *Transplant Proc* 17:921- 924.

242. VAN ZON AAJC i ELING WM 1980 Depressed malarial immunity in pregnant mice. *Infect Immunity* 28:630-632.

243. VLAANDEREN W i TREFFERS PE 1987 Prognosis of subsequent pregnancies after recurrent spontaneous abortion in first trimester. *Br Med J* 295:92-93.

244. WANG H-S, KANZAKI H, YOSHIDA M, SATO S, TOKUSHIGE M i MORI T 1987 Suppression of lymphocyte reactivity in vitro by supernatants of explants of human endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 157:956-963.

245. WEBB CG, GALL WE i EDELMANN GM 1977 Synthesis and distribution of H2 antigens in pre-implantation mouse embryos. *J Exp Med* 146:923-932.

246. WEGMAN TG 1988 Maternal T cells promote placental growth and prevent spontaneous abortion. *Immunol Lett* 17:297- 302.

247. WEINBERG ED 1984 Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. *Rev Infect Dis* 6:814.

248. WELLS M i BULMER JN 1988 The human placental bed: histology, immunohistochemistry and pathology. *Histopathology* 13:483-498.

249. WELLS M, HSI B-L, YEH C-JG i FAULK WP 1984 Spiral (uteroplacental) arteries of the human placental bed show the presence of amniotic basement membrane antigens. *Am J Obstet Gynecol* 150:973-977.

250. WITKIN SA i CHAUDHRY A 1989 Association between recurrent spontaneous abortions and circulating IgG antibodies to sperm tails in women. *J Reprod Immunol* 15:151-158.

251. WOOD GW, KAMEL S i SMITH K 1988 Immunoregulation and prostaglandin production by mechanically-derived and enzyme derived murine decidual cells. *J Reprod Immunol* 13:235-248.

252. WOOD GS, WARNER NL i WARNKE RA 1983 Anti-leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol* 131:212-216.

253. XU L, CHANG V, MURPHY A, ROCK JA, DAMEWOOD M, SCHLAFF W i ZACUR HA 1990 Antinuclear antibodies in sera of patients with recurrent pregnancy wastage. *Am J Obstet Gynecol* 163:1493-1497.

254. YEH C-JG, BULMER JN, HSI B-L, TIAN W-T, RITTERSHAUS C i IP SH 1990 Monoclonal antibodies to T cell receptor gamma/delta complex react with human endometrial glandular epithelium. *Placenta* 11:253-261.

255. YOUNG EJ i GOMEZ CI 1979 Enhancement of herpes virus type 2 infection in pregnant mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 160:416-420.

256. YOUNG HA i ORTALDO JR 1987 One-signal requirement for interferon - gamma production by human large granular lymphocytes. *J Immunol* 139:724-727.

257. ZUCKERMANN FA i HEAD JR 1986 Expression of MHC antigens on murine trophoblast and their modulation by interferon. *J Immunol* 137:846-853.

258. ZUCKERMANN FA i HEAD JR 1986 Isolation and characterization of trophoblast from murine placenta. *Placenta* 7:349-364.

## ŽIVOTOPIS

Roden sam 10.ožujka 1959. godine. Osnovnu školu završio sam u Novom Vinodolskom, a gimnaziju u Crikvenici 1977. godine. Odmah po završetku srednje škole upisao sam se na Medicinski fakultet u Rijeci gdje sam na vrijeme i s uspjehom apsolvirao 30.lipnja 1982. godine. Za vrijeme studija bio sam dvije godine demonstrator na Zavodu za anatomiju, a tri godine na Zavodu za patologiju i patološku anatomiju. Diplomirao sam 19.listopada 1982. godine, u 23. godini života. Tema diplomskog rada bila je PLACENTA PRAEVIA KAO OPSTETRIČKI PROBLEM (mentor prof.dr.Henrik Bosner). Nakon jednogodišnjeg staža položio sam stručni ispit 28.listopada 1983. godine u Rijeci. Po reguliranju vojne obaveze zaposlio sam se u Domu zdravlja u Crikvenici, gdje sam radio nepune tri godine. Školske godine 1984/85. upisao sam poslijediplomski studij Opće kliničke patofiziologije i do sredine ožujka 1986. godine položio sve ispite. Magistarski rad pod naslovom UČESTALOST MOLARNOG GRAVIDITETA S OSVRTOM NA PATOHISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE (mentori prof.dr.Henrik Bosner i mr.sc. Josip Sabolić) obranio sam 4.ožujka 1987. godine. Na Medicinski fakultet u Rijeci, na radno mjesto mladeg istraživača, primljen sam 1.kolovoza 1987. godine (za znanstveni projekt IMUNOLOGIJA REPRODUKCIJE na Klinici za ginekologiju i porodništvo KBC u Rijeci). Na Klinici sam kao znanstveni asistent i specijalizant iz ginekologije i opstetricije uključen u nastavu studenata medicine. U protekle tri godine bio sam aktivni učesnik na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova, a objavio sam i više znanstvenih i stručnih radova. U lipnju 1990. godine podnio sam prijavu za stjecanje doktorata znanosti. U veljači 1991. godine prihvaćena je tema doktorske disertacije pod naslovom IMUNOHISTOLOGIJA I FUNKCIJSKA AKTIVNOST LIMFOCITA HUMANE DECIDUE U PRVOM TROMJESEČJU PATOLOŠKIH TRUDNOĆA a za mentore su mi određeni prof.dr.Daniel Rukavina i doc.dr.Nikola Matejčić.