

# Zastupljenost citolitičkih i apoptotičkih molekula tijekom trudnoće

---

**Rubeša, Gordana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**1997**

*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:188:154998>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-06**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Gordana Rubeša**

**ZASTUPLJENOST CITOLITIČKIH I APOPTOTIČKIH  
MOLEKULA TIJEKOM TRUDNOĆE**

**DISERTACIJA**

**SVEUČILIŠNA KNJIŽNICA  
RIJ E K A**



**930024913**

**Rijeka, 1997.**

## I AUTOR

Ime i prezime	GORDANA RUBEŠA
Datum i mjesto rođenja	12. srpnja 1963. Drniš
Naziv fakulteta, odnosno organizacije za postdiplomski studij i datum završene nastave II i III stupnja	Medicinski fakultet u Rijeci 1988. Medicinski fakultet u Zagrebu 1993.
Sadašnje zaposlenje	asistent Medicinskog fakulteta u Rijeci

## II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA

Naslov rada	ZASTUPLJENOST CITOLOŠKIH I APOPTIČKIH MOLEKULA TIJEKOM TRUDNOĆE
Broj stranica, slika, tabela, bibliografskih podataka	133 str., 20 slike, 4 tab., 268 ref.
Ustanova i mjesto gdje je disertacija izrađena	Medicinski fakultet u Rijeci
Znanstvena disciplina	BIOMEDICINA
Mentori	Prof.dr.sc.Daniel Rukavina
Fakultet na kojem je disertacija obranjena	Medicinski fakultet u Rijeci

## III OCJENA I OBRANA

Datum prijave teme	4. veljače 1995.
Datum predaje rada	12. listopada 1996.
Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen	21. siječnja 1997.
Sastav povjerenstva koje disertaciju ocijenilo	prof.dr.sc.Ljiljana Randić, doc.dr.sc. Herman Haller, prof dr.sc. Asim Kurjak i prof.dr. Daniel Rukavina
Datum obrane disertacije	7. veljače 1997.
Sastav povjerenstva pred kojim je disertacija obranjena	I s t i
Datum promocije	

Ova je disertacija izrađena na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. Klinički materijal sakupljan je u Klinici za ginekologiju i porodništvo Kliničkog bolničkog centra Rijeka.

Voditelj: Prof. dr. sc. Daniel Rukavina

Rad ima 134 stranica, 24 slike i 4 tablice.

Zahvaljujem se prof. dr. Danielu Rukavini na stručnom vođenju, idejnim rješenjima i beskrajnom strpljenju pri izradi ovog rada. Prof. dr. Rukavina je uvijek dozvoljavao da izrazim svoju kreativnost u istraživanju imunoloških tajni trudnoće.

Hvala prof. dr. Ljiljani Randić, mom bliskom suradniku doc. dr. Hermanu Halleru i svom osoblju Klinike za ginekologiju i porodništvo Kliničkog bolničkog centra Rijeka, posebno Odjelu za planiranje obitelji bez čije susretljivosti nebi mogla izraditi ovaj rad.

Eksperimentalni rad zahtijeva rad cijele grupe. Stoga se zahvaljujem mojim kolegama s kojima sam donedavno dijelila svo dobro i loše istraživačkog rada: Lei Gudelj, Peri Lučinu, Suzani Španjol-Pandelo, Gordani Laškarin i Ivici Bedenickom. Posebnu zahvalnost osjećam prema laborantici gđi. Davorki Perčinić i gđi. Ivani Godnič koje su bitno pridonjele u tehničkoj izvedbi ovog rada. Hvala svima na Zavodu što su uvijek bili uz mene.

Veliko hvala mojoj obitelji na strpljenju i podršci. Posebno se zahvaljujem mom sinu Karlu koji je, iako još mali, nalazio razumjevanje i oprostaj za brojna moja odsustva i uvijek bio i biti će snaga mojih ambicija, rada i postojanja.

## SAŽETAK

Preživljavanje fetusnog alotransplantata ovisi o lokalnim imunoregulacijskim mehanizmima koji su prisutni na spoju majčinih (decidua) i fetalnih (trofoblast) tkiva. Zbog nazočnosti velikog broja stanica koje u svojim granulama sadrže perforin, a nalaze se u decidui, otvara se pitanje uloge citolitičkih mehanizama tijekom normalne trudnoće. Na molekularnoj razini definirana su dva temeljna citolitička mehanizma posredovana: perforinom, odnosno kompleksom Fas ligand-Fas. U ovom radu smo istraživali nazočnost oba mehanizma u decidui i krvi tijekom normalne trudnoće. Nadalje, 1990. godine prvi put je opisan TJ6 protein, kojemu se pripisuju brojne uloge kao što je imunoregulacijska uloga u timusnoj selekciji, efektorska uloga u programiranoj smrti stanica (apoptozi), te funkcionalna uloga u preživljavanju fetalnog alografta tijekom normalne trudnoće u miša. Tako smo uz perforin i Fas-ligand pozitivne stanice, kao citolitičke efektorske stanice, istraživali i prisustvo TJ6 proteina, kao jedne imunoregulacijske ili apoptotičke molekule tijekom normalne trudnoće u čovjeka.

Decidua prvog tromjesečja trudnoće obiluje stanicama koje su jedinstvene za ovo tkivo, a nose fenotipsko obilježje  $CD56^+CD16^-P^+$ . Limfociti periferne krvi (LPK) tijekom normalne trudnoće mijenjaju fenotipska obilježja. Tako smo uočili porast NK i citotoksičnih limfocita T na terminu poroda, u odnosu na prvo tromjesečje trudnoće. I perforin pozitivni limfociti periferne krvi mijenjaju fenotipska obilježja tijekom trudnoće. Tako dominantnu populaciju LPK u prvom tromjesečju trudnoće čine  $P^+CD56^{bright+}CD16^-$  stanice (stanice decidualnog fenotipa), dok je na terminu poroda uočena dominacija  $P^+C56^{dim+}CD16^+$  LPK (stanice fenotipa negravidnih žena).

Istraživanja mehanizama perforinom posredovane citotoksičnosti otežana su zbog problema dugotrajne kultivacije perforin pozitivnih stanica. Zbog toga je jedan od ciljeva naših istraživanja bio utvrditi uvjete za dugotrajniju kultivaciju perforin pozitivnih stanica. Pošto humana decidua obiluje perforin pozitivnim stanicama (42% od svih decidualnih limfocita sadrži perforin), istražili smo mehanizme odgovorne za opstajanje perforina u kulturi decidualnih limfocita. 18-satna kultivacija perforin pozitivnih limfocita periferne krvi negravidna, gravida ili decidualnih limfocita uvjetuje dramatičan pad perforin pozitivnih stanica i sadržaja perforina u stanici. Stimulacija perforin pozitivnih limfocita periferne krvi ili decidue prvog tromjesečja trudnoće s anti-

CD3 mAt, PHA, rIL-2 ili kombinacijom istih nije uspjela blokirati gubitak perforina u 18-satnoj kulturi. Međutim, kokultivacija limfocita periferne krvi i decidualnih limfocita s decidualnim makrofagima, uspješno prevenira gubitak perforinskih molekula iz stanica koje sadrže perforin. Singenički decidualni makrofagi uz stimulaciju sa PHA induciraju čak i povećanje ekspresije perforina, kako u limfocitima periferne krvi tako i u decidualnim limfocitima. Nestajanje perforina u 18-satnoj kulturi limfocita periferne krvi i decidualnih limfocita popraćeno je istovremenim porastom ekspresije Fas-liganda na površini limfocita periferne krvi i decidualnim limfocitima, koji inače nije prisutan na tim stanicama.

TJ6m protein prisutan je na limfocitima periferne krvi i decidualnim limfocitima tijekom prvog tromjesečja normalne trudnoće. Wester blot lizat decidualnih limfocita pokazao je da se TJ6m pojavljuje u tri različite molekulske veličine: 67, 60 i 32 KD. Na isti način lizat LPK istih trudnica pokazuje također tri trake u Western blotu od približno 67, 50 i 37 KD. TJ6 postotno je više zastupljen na DL nego na LPK prvog tromjesečja trudnoće. Kultivacija stanica s monoklonskim protutijelom na CD3 molekulu povećava ekspresiju TJ6 molekule na površini LPK.

Iz svega predhodno navedenog možemo zaključiti da na dodirnoj plohi majčinih tkiva i fetoplacentne jedinice tijekom normalne trudnoće dolazi do izražavanja i citolitičkih i apoptotičkih molekula. Jedna od citolitičkih molekula, perforin, visoko je zastupljena u decidualnim limfocitima, ali je njihova citolitička aktivnost veoma niska u usporedbi sa perforin pozitivnim LPK. Druga citolitička molekula, Fas-ligand, gotovo i nije prisutna tijekom normalne trudnoće. Povećana ekspresija ove molekule viđena je jedino u *in vitro* uvjetima prilikom smanjenja ekspresije perforina u kulturi decidualnih limfocita. TJ6 protein, kao imunoregulacijska ili apoptotička molekula izražava se na limfocitima periferne krvi, a posebno na decidualnim limfocitima tijekom prvog tromjesečja trudnoće.

## SUMMARY

Survival of foetal allograft in mammals depends of local immunoregulatory mechanisms operating at the fetomaternal interface. Large number of cells containing cytotoxic molecule perforin (P) within their cytoplasmic granules is found in decidua which opens question of the role of cell-mediated cytotoxicity during the first trimester pregnancy. Cell cytotoxicity has been studied for number of years, and two principal molecular mechanisms have been defined: perforin-mediated and Fas-mediated. In this work we investigated the presence of both mechanisms in decidual and peripheral blood during normal pregnancy. T<sub>H</sub>1 protein was first described in 1990 as one of immunoregulatory proteins in the thymic selection, or as one of effector proteins in the apoptosis, and finally as one of functional proteins in mice. Therefore, we aimed our investigation towards establishment whether perforin positive and Fas-ligand positive cells, as a cytotoxic cells, and T<sub>H</sub>1 positive cells as one type of immunoregulatory or apoptotic cells, are present in the first trimester human pregnancy.

Early pregnancy human decidua contains large number of natural killer (NK)-like cells which are CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>P<sup>+</sup>, apparently unique for this tissue. Peripheral blood lymphocytes change their phenotypic characteristics during normal pregnancy. Namely, the higher number of NK and cytotoxic T lymphocytes are present in term pregnancy compared to the first trimester of pregnancy. Perforin positive lymphocytes of peripheral blood also change their phenotypic characteristic during pregnancy. Dominant population of PBL in first trimester of pregnancy are P<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> cells in contrast to term pregnancy, where P<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> PBL are predominant population.

The investigation of perforin-mediated cytotoxic mechanisms is difficult due to the problems in long-term cultivation of perforin-positive cells. The investigations presented here are aimed towards establishment of long-term culture conditions for perforin. In the early human decidua 42% of all decidual lymphocytes contain perforin. Therefore, we investigated mechanisms responsible for maintenance of perforin positive cells in culture of decidual lymphocytes. 18-hours cultivation of P<sup>+</sup> of nonpregnant, pregnant PBL, or decidual lymphocytes causes significant decrease of P<sup>+</sup> cells. The loss of P<sup>+</sup> cells couldn't be prevented by stimulation of DL with anti-CD3 mAb, PHA, rIL-2 or combination of those agents in 18 hours cultivation. Co-cultivation of P<sup>+</sup> cells with



decidual macrophages successfully prevent the loss of P<sup>+</sup> PBL. Co-cultivation of P<sup>+</sup> cells with combination of syngeneic macrophages and PHA even increases the percentage of P<sup>+</sup> PBL and P<sup>+</sup> DL. The loss of P<sup>+</sup> cells that appears during 18-hours cultivation was paralleled by an increase of Fas ligand expressing first trimester PBL and DL. Namely, Fas ligand wasn't expressed on no-cultivated first trimester PBL and DL.

TJ6 membrane protein was expressed on first trimester pregnancy PBL and DL. Western blott analysis of decidual lymphocytes showed that the TJ6m protein appears in three different molecular weights: 67, 60 and 32 KD. The staining of lysates of peripheral blood lymphocytes of the same patients showed, in addition to the 67 KD molecule, two other molecules but of different molecular mass: 50 and 37 KD. The percentage of TJ6<sup>+</sup> first trimester pregnancy DL was higher then of PBL of the same pregnant female. CD3 mAb causes up-regulation of TJ6 molecules on surface of PBL.

Based of the previous results we can conclude that the cytolytic and apoptotic molecules were expressed during normal pregnancy. One of cytolytic molecules, perforin, was expressed in higher percentage on DL but with low cytolytic activity compared to P<sup>+</sup> PBL. The other cytolytic molecule, Fas-ligand, was almost absent during normal pregnancy. Decreased expression of Fas-ligand could be seen *in vitro* only following the decrease of expression of P<sup>+</sup> cells in culture of DL. TJ6 protein, as one of immunoregulation or apoptotic molecules was expressed on PBL, moreover in higher percentage on DL during the first trimester pregnancy.

# K A Z A L O

## SAŽETAK

## SUMMARY

<b>1. UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	1
<b>1.1. FENOTIPSKU I FUNKCIJSKU KARAKTERISTIKU         DECIDUALNIH LIMFOCITA</b> .....	2
<b>1.2. CITOTOKSIČNOST POSREDOVANA STANICAMA         I PERFORINOM</b> .....	4
<b>1.3. CITOLITIČKI MEHANIZMI I STANIČNA SMRT</b> .....	5
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	8
<b>2.1. SUVREMENI POGLEDI NA IMUNOLOGIJU TRUDNOĆE</b> .....	8
2.1.1. Fetus kao alotransplantat.....	8
2.1.2. Imune interakcije na spoju između majčinih i fetalnih tkiva .....	8
2.1.3. Ekspresija antigena tkivne srodnosti na stanicama trofoblasta.....	9
2.1.3.1. HLA-G "neklasični" antigen razreda I MHC sustava.....	10
2.1.3.2. HLA-G transgenični miševi .....	13
2.1.3.3. Tolerancija HLA-G antigena u transgeničnih miševa za HLA-G .....	16
2.1.3.4. Mehanizmi regulacije izražavanja antigena razreda I MHC sustava na stanicama trofoblasta.....	18
<b>2.2. ULOGA CITOKINA I HORMONA U POSTELJICI</b> .....	20
2.2.1. Glavna obilježja.....	21
2.2.2. Način ostvarivanja učinaka.....	26
2.2.3. Citokini u trudnoći-regulacija njihovog lučenja.....	28
<b>2.3. DECIDUALNO TKIVO</b> .....	30
2.3.1. Imunokompetentne stanice humane decidue prvog tromjesečja trudnoće.....	30
2.3.1.1. Makrofagi .....	30
2.3.1.2. Limfociti T.....	31
2.3.1.3. NK stanice.....	32
2.3.1.3.1. NK stanice u trudnoći.....	34
2.3.1.3.2. Saznanja o NK stanicama u trudnoći dobivena istraživanjem na laboratorijskim glodavcima.....	36
<b>2.4. MEHANIZMI CITOTOKSIČNOSTI</b> .....	37
2.4.1. T stanična citotoksičnost.....	37
2.4.2. NK stanična citotoksičnost.....	37
<b>2.5. PERFORIN</b> .....	38
2.5.1. Građa perforina.....	38
2.5.2. Zastupljenost perforina u stanicama i staničnim linijama.....	39

2.5.3. Regulacija ekspresije perforina.....	40
2.5.4. Uloga perforina u citolizi.....	42
2.5.5. Miševi sa mutacijom gena za perforin.....	46
<b>2.6. STANIČNA SMRT.....</b>	<b>47</b>
2.6.1. Apoptoza.....	47
2.6.1.1. Molekule koje sudjeluju u apoptozi.....	48
2.6.1.2. TJ6.....	49
2.6.1.2.1. TJ6 protein.....	50
2.6.1.2.2. Ekspresija TJ6 proteina u trudnoći miša .....	51
2.6.1.2.3. Ekspresija TJ6 proteina na limfocitnim subpopulacijama gravidnih žena.....	52
2.6.1.2.4. Uloga TJ6 u trudnoći.....	52
2.6.1.2.5. TJ6 i programirana smrt stanica.....	53
2.6.1.3. Fas antigen-struktura i ekspresija.....	54
2.6.1.3.1. Fas-ligand.....	54
2.6.1.3.2. Citolitička i apoptotička aktivnost posredovana Fas antigenom.....	55
2.6.1.3.3. Fas i Perforin u T staničnoj citotoksičnosti.....	55
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>59</b>
<b>3.1. KEMIKALIJE.....</b>	<b>59</b>
<b>3.2. MEDIJI I PUFERI.....</b>	<b>60</b>
<b>3.3. LABORATORIJSKO PLASTIČNO POSUĐE.....</b>	<b>62</b>
<b>3.4. TKIVA I STANICE.....</b>	<b>62</b>
3.4.1. Dobivanje limfocita periferne krvi.....	62
3.4.2. Decidualno tkivo.....	62
3.4.2.1. Dobivanje suspenzije decidualnih leukocita iz decidualnog tkiva.....	63
3.4.2.2. Kultiviranje decidualnih leukocita.....	63
<b>3.5. ODREĐIVANJE STANIČNIH ANTIGENA PROTOČNOM CITOMETRIJOM.....</b>	<b>64</b>
3.5.1. Fiksacija i permeabilizacija staničnih membrana.....	64
3.5.2. Direktna imunofluorescencija .....	65
3.5.3. Indirektna imunofluorescencija.....	65
3.5.4. Istovremeno bojenje dvaju površinskih antigena.....	66
3.5.5. Istovremeno obilježavanje dvaju antigena, unutarstaničnog (perforina) i površinskog (membranski antigen).....	66
<b>3.6. WESTERN BLOTT.....</b>	<b>67</b>
3.6.1. Liziranje stanica za Western blott.....	67
3.6.2. Pripreme gelova za Western blott.....	68
3.6.3. Elektroforeza i Western transfer.....	68

3.7. STIMULACIJA LPK i DL SA ANTI-CD3 mAt, PHA i rIL-2 .....	69
3.8. KULTIVIRANJE LPK I DL SA SINGENIČKIM I ALOGENIČKIM DECIDUALNIM MAKROFAGIMA.....	70
<b>4. REZULTATI</b> .....	71
4.1. Promjene fenotipskih karakteristika LPK tijekom trudnoće .....	71
4.2. Perforin pozitivni limfociti periferne krvi mijenjaju fenotipska obilježja tijekom trudnoće.....	74
4.3. Decidualni makrofagi tretirani mitomicinom sudjeluju u održavanju perforina u perforin pozitivnim stanicama .....	75
4.4. Decidualni makrofagi stimuliraju porast perforina u NK i citotoksičkim limfocitima T periferne krvi negravida .....	76
4.5. Kokultivacija perforin pozitivnih stanica s decidualnim makrofagima uspješno prevenira gubitak perforinskih molekula iz stanica koje sadrže perforin .....	79
4.6. Stimulacija perforin pozitivnih limfocita periferne krvi prvog tromjesečja čnormalne trudnoće (anti-CD3 mAt, PHA, rIL-2 te kombinacijom istih) čne blokira gubitak perforina u 18 satnoj kulturi.....	81
4.7. Decidualni makrofagi usppješno blokiraju gubitak perforin pozitivnih limfocita periferne krvi prvog tromjesečja trudnoće .....	82
4.8. Singenički decidualni makrofagi uz stimulaciju sa PHA induciraju povećanje ekspresije perforina u limfocitima periferne krvi prvog tromjesečja trudnoće .....	83
4.9. Decidualni perforin pozitivni limfociti u uvjetima 18 satne kultivacije dramatično nestaju.....	89
4.10. Singenički decidualni makrofagi uspješno preveniraju gubitak perforin pozitivnih decidualnih limfocita u 18 satnoj kulturi.....	84
4.11. Nestajanje perforina u 18 satnoj kulturi LPK i DL praćeno je porastom postotne ekspresije Fas liganda na površini kultiviranih stanica.....	85
4.12. TJ6m protein prisutan je na površini limfocita periferne krvi i decidue prvog tromjesečja trudnoće .....	87
4.13. TJ6m pozitivni limfociti periferne krvi i decidue prvog tromjesečja trudnoće fenotipski se razlikuju.....	88
4.14. CD3 monoklonsko protutijelo djeluje apregulacijski na ekspresiju TJ6 molekule na površini LPK.....	91
4.15. Razlike u ekspresiji TJ6m molekule između decidualnih limfocita i limfocita periferne krvi prvog tromjesečja trudnoće .....	92
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	94
<b>6. ZAKLJUČNI PREGLED</b> .....	104
<b>7. LITERATURA</b> .....	106

## ŽIVOTOPIS

## 1. UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME

Trudnoća u sisavaca još uvijek je nerazriješena misterija uspješnog toleriranja nesrodnih (očevih i embrionalnih) antigena, eksprimiranih na fetoplacentnoj jedinici, od strane kompetentnog imunološkog sustava majke. Majčin imunološki sustav je istovremeno djelotvoran u reagiranju na ostale tuđe antigene kao što su mikroorganizmi ili tumorski antigeni (35). Toleriranje fetusa od strane majke ne ostvaruje se izostankom prepoznavanja embrijskih antigena, već upravo suprotno, odgovarajuće prepoznavanje embrijskih antigena je neophodno za uspješnu trudnoću (96). Tijekom trudnoće razvijaju se brojni zaštitni mehanizmi, sistemski i lokalni koji doprinose zaštiti fetoplacentne jedinice. Danas se pozornost pridaje mehanizmima koji djeluju lokalno, na spoju majčinih i fetalnih tkiva u decidui, a posredovani su i od strane majke i od fetusa (81). U tome se posebna uloga pridaje stanicama trofoblasta, jer su to jedine stanice fetalnog porijekla koje dolaze u direktan kontakt sa stanicama majčine decidue i s majčinom krvlju. Zbog tog strateškog položaja danas se pretpostavlja da stanice trofoblasta naj snažnije doprinose zaštiti alogeničke fetoplacentne jedinice tijekom trudnoće, proizvodeći imunosupresivne tvari i hormone s imunosupresivnim djelovanjem, inducirajući *in situ* produkciju majčinih supresorskih stanica i/ili blokirajućih antigena (43,98,64). Vjerojatno nije od ništa manjeg značenja činjenica da ove stanice na jedinstven način reguliraju ekspresiju MHC gena i njihovih produkata. Naime, MHC antigeni klase I i klase II nisu izraženi na stanicama trofoblasta. S druge strane na ovim stanicama se eksprimiraju nekласični HLA antigeni klase I (HLA-G antigen), koji doprinose zaštiti ovih stanica protiv citolitičkog djelovanja NK stanica, a istovremeno sami ne stimuliraju destrukciju stanica citotrofoblasta majčinim citotoksičkim limfocitima T (CTL) (91,113,209).

## 1.1 Fenotip i funkcijske karakteristike decidualnih limfocita

Imunohistološkim i imunofluorescentnim tehnikama saznalo se mnogo o zastupljenosti i fenotipskim karakteristikama glavnih podvrsta imunokompetentnih stanica: makrofaga, limfocita T i decidualnih granuliranih limfocita (LGL), koje su jedinstvena podvrsta stanica za tkivo sekrecijskog endometrija i decidue u čovjeka, te u metrijalnoj žlijezdi koja se formira tijekom trudnoće u glodavaca (24,107).

Makrofagi, najbrojnija podvrsta, su nazočni u svim periodama menstruacijskog ciklusa u endometriju, a broj im je povećan u kasnoj sekrecijskoj fazi i u decidui prvog tromjesečja trudnoće. Većina ih eksprimira CD14, CD58, CD11c i HLA-DR antigene (81). Izražavaju aktivacijski marker HLA-DR, ali im je uloga u prezentiranju antigena zakočena, vjerojatno izlučevinama stanica strome i progesteronom (192).

Limfociti T, stanice koje ekspimiraju CD3 antigen, čine postotno najmanju podvrstu stanica u decidui i endometriju. Veća je zastupljenost CD8 nego CD4 pozitivnih stanica. Najnovija istraživanja dokazuju postojanje T staničnog receptora (TCR) i to uglavnom heterodimera alfa/beta na limfocitima T u decidui (46,153,31). Postojanje TCR na limfocitima T ne može se nedvojbeno vezati uz prepoznavanje neklasičnih antigena razreda I MHC sustava na stanicama trofoblasta (HLA-G antigen), kao što je već rečeno. Ipak, postoji mogućnost da se CD8<sup>+</sup> decidualni limfociti vežu za nepolimorfnu regiju molekule HLA-G (167) i tako dobiju signal potreban za aktivaciju CD8<sup>+</sup> stanica i bez interakcije antigena i TCR.

Tijekom prvog tromjesečja trudnoće najbrojniji su veliki granulirani limfociti (LGL). Te stanice ne nose ni TCR ni CD3 molekulu na svojoj membrani, već većina eksprimira CD2 molekulu. Prisustvo CD45 molekule na površini tih stanica govori da se radi o stanicama porijeklom iz koštane srži, a CD56 i CD38 antigen obilježava ih kao NK stanice. Ipak odsustvo CD16 i CD57 antigena, koji također obilježavaju NK stanice, upućuje da se radi o "neklasičnim" NK stanicama (22,32). Ove stanice su niske

proliferativne sposobnosti, a NK aktivnost im je znatno slabija od NK aktivnosti limfocita periferne krvi (26,35), iako su njihove granule bogate perforinskim molekulama.

Već smo napomenuli da su imunomodulacijski mehanizmi u trudnoći brojni, a svode se na slijedeće: prvo, stanice sinciciotrofoblasta, kao i citotrofoblasta ne izražavaju antigene glavnog sustava tkivne srodnosti (MHC), niti klasične antigene razreda I (HLA-A, B, C), niti antigene razreda II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR). U trofoblastnim stanicama zbog blokiranja transkripcije i translacije visokopolimorfni "klasičnih" antigena razreda I MHC, dozvoljava se ekspresija samo "neklasičnih" nepolimorfni antigena razreda I MHC, i to HLA-G (91). Drugo, što je proizašlo iz naših predhodnih istraživanja, iako se citolitička molekula perforin nalazi u višim koncentracijama upravo u tkivu decidue negoli u bilo kojem drugom mjestu u organizmu, u decidui se generiraju neklasične NK stanice niskog citolitičkog potencijala fenotipa:  $CD56^+CD16^-CD3^+P^+$  dok klasičnih NK  $CD56^+CD16^+P^+$  gotovo i nema. I reakcije ADCC tipa ozbiljno su kompromitirane jer su posredovane upravo sa  $Fc\gamma RIII^+$  stanicama ( $CD16^+$  stanice). Treće, u decidui nema ni "klasičnih" citotoksičnih limfocita T fenotipa  $CD3^+CD8^+P^+$  već postoje dvije podvrste  $CD8^+$  decidualnih limfocita, jedna fenotipa  $CD8^{bright}+CD3^+CD56^-P^-$  i druga fenotipa  $CD8^{dim}+CD3^-CD56^+P^+$ . Četvrto, među decidualnim limfocitima gotovo i nema limfocita B, pa je produkcija specifičnih protutijela vjerojatno znatno otežana.

Zaštitnu ulogu u trudnoći igraju i hormoni, steroidni, proteinski i glikoproteinski, koji mogu modulirati imuni odgovor. Tako progesteron ima lokalni imunopotiskivački učinak koji je dokazan i *in vivo* i *in vitro* (234). Humanom korionskom gonadotropinu se pripisuje uloga u ometanju limfocita pri prepoznavanju u fetoplacentnoj jedinici.

## 1.2 Citotoksičnost posredovana stanicama i perforinom

Pažnju brojnih autora još uvijek zaokuplja biološka uloga perforina, a posebno njegova uloga u trudnoći. Humani perforin je proteinska molekula veličine oko 60KD, koja pokazuje visoku homologiju C9 komponenti komplementa i to upravo s inzerirajućim dijelom C9 komponente. S toga ne iznenađuje sličnost u tvorbi pora u ciljnoj stanici s C9 komponentom komplementa i perforina (119). Perforin je izoliran iz citoplazmatskih granula NK-staničnih klonova i klonova citotoksičnih limfocita T (187). Perforin konstitutivno visoko ekspimiraju NK stanice i gama/delta limfociti T. U značajnom postotku ga konstitutivno nalazimo u CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> limfocitima. Konstitutivno se ne ekspimiraju u CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> limfocitima, ali se njegova ekspresija može inducirati IL-2 i monoklonskim protutijelom protiv CD3 molekule (258). Na isti način je perforin inducibilan u CD4<sup>+</sup> limfocitima. Ubilački učinak perforin<sup>+</sup> stanica ostvaruje se direktnim kontaktom s ciljnom stanicom i to tako da se aktivacijom adhezijskih molekula u stanicu prenosi signal potreban za pokretanje egzocitoze od strane ubilačkih stanica (185). Taj fenomen dokazan je time-lapse video testom, pod elektronskim scanning mikroskopom, između decidualnih perforin<sup>+</sup> stanica i stanica trofoblasta (24). Na temelju predhodnih rezultata dobivenih u našem laboratoriju o postojanju velikog citolitičkog potencijala u decidui, kao nigdje drugdje u organizmu, nameće se razmišljanje o vrlo preciznom reguliranju aktivacije ili supresije perforin pozitivnih stanica na spoju majčinih tkiva i semialogenog tkiva fetusa. Mehanizmi odgovorni za poticanje ekspresije perforina u NK, gama/delta TCR<sup>+</sup> stanicama i CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> stanicama (konstitutivno), te u ostalim CD8<sup>+</sup> i dijelom u CD4<sup>+</sup> stanicama (inducirano), te mehanizmi za ograničavanje ekspresije perforina u NK i T stanica, nisu do danas dovoljno istraženi, a niti razjašnjeni.



### 1.3 Citolitički mehanizmi i stanična smrt

Kroz mnoge studije uočeno je da postoji perforin-ovisan i perforin-neovisan mehanizam lize ciljne stanice. Tako neki Th-1 i Th-2 CD4<sup>+</sup> stanični klonovi, koji su perforin negativni, efikasno liziraju ciljne stanice sa jezgrom, slično kao što to čine CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup> CTL (118). Jedna od najvažnijih molekula na ciljnim stanicama preko koje CD4<sup>+</sup> T stanice ostvaruju svoje citotoksične učinke je Fas antigen (227). Brojne su studije koje pokazuju povezanost ekspresije Fas antigena i stanične smrti tih stanica.

Stanična smrt u multicelularnom organizmu može biti slučajna ili programirana. Morfološke promjene programirane smrti stanica obično je apoptoza a ne nekroza stanica. J. John Cohen (37) je opisao promjene u apoptozi diskutirajući usputno o mogućim regulacijskim mehanizmima i genima, te naglašavajući značajnu razliku između apoptoze i nekroze.

U nekrozi značajne promjene su u mitohondrijima. Mijenja se njihov oblik i funkcija, te stanica veoma brzo gubi homeostazu. Uzrok smrti stanice primarno je u promjeni membrane, naime ona gubi mogućnost reguliranja osmotskog tlaka, te stanica bubri i puca. Sadržaj se izljeva u međustanični prostor i izaziva upalni odgovor (37).

Apoptoza je stanična smrt u kojoj je proces umiranja jedva zamjetljiv. Razlog staničnog umiranja, kao i put aktivacije različit je za različite stanične tipove, ali je mehanizam umiranja zajednički svim staničnim tipovima. Tako se apoptoza limfocita opisuje u nekoliko stadija: a) normalna stanica s citoplazmom i heterogenetičkim kromatinom jezgre b) gubitak staničnog volumena s gusto nakupljenim citoplazmatskim organelama i klampiranim kromatinom jezgre c) stanica pokazuje izdanke (zeosis) d) nastavak smanjivanja staničnog volumena, a kromatin potpuno propada e) jezgra propada u crnu rupu f) tako kolabirana jezgra se cijepa na kuglice i konačno g) fragmentacija stanice na apoptotičke dijeliće (37). Apoptoza je genetički regulirana. Pojedinačni geni mogu biti uključeni u apoptozu na dva načina: jedni se eksprimiraju u stanicama koje ulaze u apoptozu, drugi

moduliraju taj proces. Tako c-myc proto-onkogen igra ulogu u regulaciji odabira između proliferacije i apoptoze (54). Adenovirus gen E1A mogući je analog c-myc (190). Anti-onkogen p53 također je uključen u apoptozu. Produkt je zastoja stanične proliferacije (65) i može rezultirati prekapćanjem u proliferaciju ravnu smrti. Onkogen bcl-2, mogući je anti-apoptotički gen, ali ne može zaštititi ciljnu stanicu od citotoksičnih učinaka citotoksičnih T stanica (247). TRPM-2 gen, kojeg još nazivaju SGP-2, eksprimira se u mnogim tkivima, primarno u urogenitalnom traktu tijekom apoptoze. RP-2 i RP-8 su dva gena čija ekspresija raste nakon indukcije apoptoze u timocita (175).

Posebnu pažnju zaokuplja Fas gen, čiji je produkt Fas antigen, membranski protein homologan faktoru nekroze tumora i receptoru neuralnog čimbenika rasta. Fas je analog humane površinske molekule otkrivene kao APO-1 (168). Otkrivena je različita ekspresija Fas antigena u različitim staničnim podvrstama i u različitim tkivima. Tako je viđen u timusu, slezeni, ovariju, srcu, te u mijeloidnim stanicama i fibroblastima (250,147), te u aktiviranim T i B limfocitima (147,231). Apoptoza se može inducirati interakcijom površinske molekule Fas ili APO-1 sa specifičnim antitijelom za te molekule (168). Fas molekulu veže Fas ligand, molekula koja je eksprimirana na različitim CTL staničnim linijama (186), aktiviranim splenocitima (186) i tkivu testisa (174). Fas ligand vežući se za Fas molekulu na ciljnim stanicama posreduje u apoptozi tih stanica (95), a jedna je od mogućih efektorskih molekula u CTL-posredovanoj citotoksičnosti, čiji mehanizam još nije jasan. Fas i Fas-ligand eksprimiraju se zajedno na aktiviranim T limfocitima, što sugerira da oni sudjeluju u kontroli staničnog rasta i to primarno putem stanične smrti koja je posredovana međusobnom interakcijom Fas-liganda i Fas molekule (248).

TJ-6 je također jedna od efektorskih proteinskih molekula programirane smrti stanica. Smatra se da je TJ-6 protein s imunosupresivnim djelovanjem, pa se primarno nazivao T supresorski faktor, koji možda igra važnu ulogu u preživljavanju fetalnog semialotransplantata

tijekom trudnoće. Početne studije pokazale su da je moguće inducirati potpunu ablaciju trudnoće u mišica koje su bile tretirane s anti-TJ6 monoklonskim protutijelom (163). TJ6 gen kodira protein od približno 98 KD, čije strukturne analize sugeriraju postojanje dviju regija. Jedna regija je hidrofobni karboksilni kraj koji ima 7 transmembranskih vežućih regija; druga je vanjski N-terminalni kraj. Zreli protein se eksprimira kao 70 KD velik protein koji se posttranslacijski, proteolitičkim procesima, može modificirati u dva manja proteina. Veći od približno 50KD sadži transmembranski dio molekule TJ6 i nazvan je membranski TJ6 (TJ6m) te manji protein od 20 KD koji sadrži N-terminalni kraj i topljiv je protein, a nazvan je TJ6s (od eng. soluble TJ6 protein). Ta dva proteina mogu se dokazati pomoću dvije sekvence aminokiselina koje su 96-100% identične u žena i mišica što ukazuje na njegovu konzerviranost, a i vjerojatno veliko značenje u trudnoći. TJ6m se dokazuje sekvencom od 488-510 aminokiseline, a TJ6s od 245-270 aminokiseline. Te su dvije sekvence ujedno uzete i za sintezu poliklonskog protutijela koje se koristi za detekciju TJ6m na staničnoj površini u tkivu, u Western blotu i ELISA-testu, te na stanicama protočnim citometrom. TJ6 je prisutan i u postovulatornom endometriju, ali u visokim koncentracijama u uterusu u vrijeme implantacije, te u drenažnim limfnim čvorovima uterusa. B limfociti periferne krvi gravidnih žena eksprimiraju TJ6, ali ne i u negravidna (163). TJ6 se smatra jednim od značajnih markera normalne trudnoće. Prisustvo TJ6 u timusu govori o njegovoj efektorskoj ulozi u progamiranoj staničnoj smrti-apoptozi, koja se u velikom obimu inače i odvija u timusu.

Iz navedenih rezultata iz literature, kao i iz dosadašnjim rezultata dobivenih u našem laboratoriju, čini se opravdano govoriti o postojanju velikog citolitičkog i apoptotičkog potencijala u neposrednom kontaktu tkiva majke sa semialogenskim presatkom (fetusom), što nameće potrebu višestrukih mehanizama regulacije ekspresije citolitičkih i apoptotičkih molekula kako bi se trudnoća uspješno održala.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1 SUVREMENI POGLEDI NA IMUNOLOGIJU TRUDNOĆE

#### 2.1.1. Fetus kao alotransplantant

Oplođnja, implantacija blastociste i uspješna trudnoća u nesrodnoj populaciji sisavaca jedinstveni je slučaj preživljavanja semialotransplantata (fetusa) u imunokompetentnom domaćinu. Tako trudnoća u sisavaca predstavlja prirodno transplantiranje alogenskih stanica u reproduktivni trakt žene. Fetus, koji se razvija iz oplodene jajne stanice, semialogenski je transplantat u punom smislu riječi, jer sadrži i antigene tkivne srodnosti oca, a koji su nepoznati majčinom imunološkom sustavu. Kako je i posteljica fetalnog porijekla, ispravnije je govoriti o razlikama između majke i fetoplacentne jedinice (198). Fetus nosi različite antigene koji mu daju određenu antigensku specifičnost u odnosu na majku. Tako posjeduje: "klasične" antigene razreda I glavnog sustava tkivne srodnosti, "neklasične" antigene razreda I glavnog sustava tkivne srodnosti (68,92,128), antigene križno reaktivne sa stanicama trofoblasta i limfocitima (TLX) (89,145,238) antigene specifične za organ (35,155) i embrionalne (onkofetalne) antigene (16,35). Unatoč ovako velikoj antigenskoj specifičnosti fetus, u pravilu, ne podliježe odbacivanju, što je inače uobičajena sudbina alotransplantata. Ipak, važno je istaknuti da fetus nije direktno u kontaktu s majčinih tkivima, već je to posteljica, a ona ima mnoge specifičnosti, o čemu će biti riječi u drugim dijelovima teksta.

#### 2.1.2. Imune interakcije na spoju između majčinih i fetalnih tkiva

Unatoč velikim razlikama u staničnim antigenima, između majčinih i fetalnih tkiva, u pravilu, ne dolazi do odbacivanja fetusa kao

alotransplantata. Unazad 30-ak godina brojna su eksperimentalna istraživanja koja pokušavaju objasniti protektivne mehanizme u trudnoći, a posebno one lokalne, na spoju majčinih i fetalnih tkiva. Postoje mnoge hipoteze o protektivnim mehanizmima koji dozvoljavaju rast i razvoj fetoplacentne jedinice, koja je u direktnom kontaktu s imunokompetentnim sistemom majke, a u osnovi se mogu svesti na slijedeće: 1) tijekom trudnoće reakcija facilitacije nadvladava reakciju odbacivanja; 2) ekspresija regulacijskih proteina, kao što je npr. CD46 antigen, koji interferiraju sa komponentama komplekta (253); 3) trofoblastno tkivo, koje je konstitutivna stanična barijera između majčine i fetalne cirkulacije, otporno je na efektorske mehanizme, uključujući i transplantacijsku reakciju na alotransplantat (253); 4) iako se radi o paradoksalnom fenomenu, čini se da bi upravo prepoznavanje od strane majčinog imunog sustava moglo imati važan utjecaj na rast i preživljavanje fetusa(253); 5) regulacija ekspresije antigena glavnog sustava tkivne podudarnosti-MHC (engl. major histocompatibility complex genes), odnosno HLA (engl. human leukocyte antigen) na trofoblastnim stanicama.

### **2.1.3. Ekspresija antigena tkivne srodnosti na stanicama trofoblata**

Već se nekoliko desetljeća pokušava utvrditi jesu li antigeni tkivne srodnosti prisutni na stanicama trofoblata. Glavni kompleks gena tkivne srodnosti (MHC) je genski kompleks, koji kodira MHC antigene, a kod čovjeka je smješten na 6. kromosomu. Postoji 17 gena ili genskih fragmenata MHC koji predodređuju antigene razreda I. Samo tri gena kodiraju visokopolimorfne "klasične" MHC antigene razreda I (-A, -B i -C), koji su odgovorni za transplantacijsku reakciju. U čovjeka se još dobro definira i mapira nekoliko genskih lokusa: HLA-E, HLA-F, HLA-G (93), HLA-H i jedan bezimeni gen 7.5.p(171). Ovi geni kodiraju "neklasične" antigene razreda I MHC. Da bi "klasični" antigeni razreda I MHC bili

efikasni u prezentiranju velikog broja različitih peptida T stanicama, nužno je održavanje visokog polimorfizma proteina koji grade MHC antigene razreda I. Zato postoji jak selekcijski signal da se taj polimorfizam održi, pa i poveća (2). U trofoblastnim stanicama transkripcija i translacija visokopolimorfnih "klasičnih" antigena razreda I MHC blokirana je, pa se zbog toga u trofoblastnim stanicama dozvoljava ekspresija samo "neklasičnih" nepolimorfnih MHC antigena razreda I, i to onih koje određuje HLA-G lokus (93).

#### **2.1.3.1. HLA-G "neklasični" antigen razreda I MHC sustava**

HLA-G gen je kloniran i sekvencioniran 1987. (62) tijekom pokusa koji su za cilj imali utvrditi sve humane gene razreda I MHC (61). Genomska DNK knjižnica, oblikovana iz DNK humane B-LCL 721 linije, pregledavana je pod nisko ograničavajućim uvjetima sa cDNK probom za HLA-B. Iz svih klonova koji su hibridizirali sa probom za HLA gene razreda I izolirana je DNK. Zatim su HindIII ulomci klonskih DNK izolirani Southern blotom i ponovo hibridizirani sa istom probom za HLA gene razreda I. Klonovi su potom svrstani prema veličini HindIII ulomka koji je hibridizirao sa probom. Ovakovim postupkom pronađena su četiri klona čiji HindIII ulomci u Southern blotu svojom veličinom nisu odgovarali ostalima, a ipak su hibridizirali sa probom za HLA gene razreda I. Ova četiri klona izolirana su iz genomske knjižnice odabrane prema veličini iz B-LCL 721.144 DNK. Jedan od njih bio je i HLA-G, prvotno nazvan HLA-6.0 (62). Analiza HLA-G (HLA-6.0) pokazala je nekoliko osobitosti (62). Ovaj gen koristi isti ustroj eksona/introna kao i klasični geni razreda I, HLA-A, -B, -C, a sukladnost u redosljedu aminokiselina u HLA-G bjelančevini iznosi 86% sa konsenzusnom sekvencom bjelančevina HLA-A, -B i -C (62,172,179). Posebnost sekvence HLA-G gena očituje se u nazočnosti terminacijskog kodona unutar drugoga kodona eksona 6, tj.

unutar čitajućega okvira osobitosti (62). Ovaj preuranjeni stop kodon ima za posljedicu bjelančevinu skraćenoga citoplazmatskog repa, što podsjeća na istu takovu osobinu Qa antigena u miša (58). Pretpostavljalo se da će HLA-G, kao i mnogi neklasični geni razreda I MHC u miša (58), pokazivati uzorak izražavanja drugačiji od klasičnih gena razreda I MHC. Ovo se je očekivanje jednim dijelom temeljilo na razlikama između sekvence prisutne u 5' postraničnoj regiji HLA-G i otprije poznatim regulacijskim elementima klasičnih gena razreda I MHC (62,114,217). Kada se poznati regulacijski elementi 5' postranične regije HLA-A2 gena usporede sa odgovarajućom postraničnom regijom HLA-G gena, uočava se sačuvan raspored TATA i CAT elemenata MHC (62,114), ali je redosljed palindroma karakterističnih za pojačivačku regiju A prekinut sa šest nekonzerviranih nukleotida u HLA-G. Količina bjelančevina koje se vežu za pojačivačku regiju A klasičnih gena razreda I MHC dobro odražava razinu izražavanja toga gena u različitim tkivima (41). Stoga se može očekivati da će prekid pojačivačke regije A imati značajan učinak na uzorak izražavanja HLA-G gena. Osim prekida u pojačivačkoj regiji A, element odgovora na interferon - IRE (engl. interferon response element) koji se u većine klasičnih gena razreda I MHC preklapa sa pojačivačkom regijom A, u HLA-G genu većinom je izbačen iz 5' postranične regije (62,217). IRE klasičnih gena razreda I MHC vežu bjelančevine čiju tvorbu potiču interferon  $\alpha$  i  $\gamma$ . Obzirom na nedostatak IRE u 5' postraničnoj regiji HLA-G, pretpostavka je da interferoni neće povisiti razinu izražavanja ovoga gena. Ovi nalazi upućuju na uzorak izražavanja HLA-G sasvim različit od uzorka za klasične gene razreda I MHC.

Prva istraživanja tkivno-specifičnog uzorka izražavanja mRNK za HLA-G rabila su tehniku testa zaštite RN-aze (257). Uskoro se je pokazalo da se uzorak izražavanja HLA-G doista razlikuje od klasičnih gena razreda I MHC. Nije bilo moguće utvrditi nazočnost mRNK za HLA-G ni u jednoj od brojnih B i T staničnih linija, u mirujućim limfocitima T

ili limfocitima T potaknutima PHA, dok je istovremeno većina ispitivanih stanica izražavala visoku razinu klasičnih antigena razreda I MHC. Ovim testom nije bilo moguće dokazati mRNK ili bjelančevinu HLA-G niti u fetusnome timusu, jetri i koži. Osjetljivijom metodom, RT-PCR (engl. reverse transcriptase-polymerase chain reaction) dokazala se niska razina mRNK u nekima od navedenih tkiva (86,94,109,217,223). Ista metoda pokazala je nazočnost niske razine mRNK za HLA-G u limfocitima periferne krvi (109), oku fetusa i odrasle osobe (134, 303\*), fetusnome timusu (217), fetusnoj jetri (128) i u keratinocitima (245). Otkriće ovoga gena iz razreda I MHC brzo je privuklo pažnju istraživača reprodukcije imunologije. Desetljeće prije no što je opisan HLA-G, reprodukcijski imunolozi predviđeli su postojanje neklasičnih antigena razreda I MHC na nekim podvrstama stanica trofoblasta (55,193). Nekoliko podvrsta stanica trofoblasta vezalo je na sebe protutijela protiv nepolimorfnih determinanti molekula razreda I MHC, ali nije vezalo protutijela specifična za očinske HLA-A, -B ili -C antigene trofoblasta (55,193). Nazočnost prijepisa za HLA-G prva je pokazala Shirley Ellis sa suradnicima, i to u koriokarcinomskoj staničnoj liniji BeWo i u normalnome trofoblastu iz korionske membrane terminske trudnoće (52). Nedugo zatim nazočnost HLA-G bjelančevine dokazana je na JEG-3 koriokarcinomskim stanicama i na stanicama citotrofoblasta prvoga tromjesečja trudnoće (115). *In situ* hibridizacijom pojašnjen je uzorak izražavanja HLA-G s obzirom na vrstu stanica u izvanembrijskim tkivima (33,261). Nadalje, rezultati sa monoklonskim protutijelima (55,193) govore o izražavanju kako mRNK, tako i HLA-G bjelančevine na stanicama trofoblasta, zapravo na dodirnome mjestu fetusnih i majčinih tkiva čitavim tijekom trudnoće. U prvome tromjesečju izražavanje HLA-G vidljivo je u sloju citotrofoblasta i u invazivnome ekstraviloznom trofoblastu, koji napušta posteljicu i prodire u majčinu deciduu i dublje, u krvne žile (33,261). Sa napredovanjem trudnoće stanjuje se sloj citotrofoblasta, pa se dio citotrofoblasta usmjeren prema šupljini maternice spaja sa priliježećom korionskom pločom, tvoreći tako



korionsku opnu (13). Preostali tanak sloj stanica citotrofoblasta i korionska opna izražavaju mRNK za HLA-G do termina porođaja (33). Djelomično i zbog nestajanja citotrofoblasta, razina mRNK za HLA-G u cjelokupnoj mRNK posteljice na terminu porođaja vrlo je niska (257). Imunohistološka istraživanja različitim mPt ukazuju na nejednoliko i nestabilno izražavanje HLA-G i u amnionu terminskih trudnoća (88).

### 2.1.3.2. HLA-G transgenični miševi

Nazočnost HLA-G na stanicama trofoblasta, na mjestu dodira sa tkivom majčine decidue, pretpostavlja se da bi ove molekule morale imati važnu ulogu u imunome odgovoru majke. Proizvodnja miševa transgeničnih za HLA-G imala je za cilj uspostavu životinjskoga modela u kojemu bi bilo moguće *in vivo* istraživanje funkcija HLA-G (213,263).

Prvo su proizvedene tri HLA-G transgenične linije upotrebom ulomaka genomske DNK dobivenih razgradnjom enzimima EcoRI/HindII veličine 5.7kb, koji su sadržavali 1.2kb 5' postranične regije, čitavu HLA-G kodirajuću regiju i 1.0kb 3' postranične regije. Pošto su sve poznate regulacijske regije za antigene razreda I MHC smještene unutar 500-600 bp od eksona 1 (30,53), očekivalo se da će se takovim odabirom ulomaka dobiti uzorak izražavanja sličan onome u ljudi. U ovome slučaju razina izražavanja ulomka od 5.7kb u ekstraembrijskim tkivima transgeničnih životinja bila je stotinu puta niža nego u humanim ekstraembrijskim tkivima G (214). Razloga za tako nisku razinu izražavanja moglo je biti više, kao što je: (1) nedostatak trans-aktivacijskih čimbenika u miša neophodnih za izražavanje HLA-G; nedostatak cis-regulacijskih elemenata u ulomku od 5.7kb ili (2) netransgenične pseudogavidne majke prepoznaju i odbacuju fetoplacentnu jedinicu sa visokom razinom izražavanja HLA-G kao tkivo alotransplantata.

Tvorba matičnih transgeničnih miševa za HLA-G složen je postupak genetskog inženjeringa. Naime, u jednostanične embrije miša injiciran je transgenični ulomak, i embriji su potom implantirani u četiri različite skupine pseudogavidnih majki (214). Pseudogavidne ženke Swiss miševa, korištene u prvotnim pokusima poslužile su kao kontrolni primaoci (ne izražavaju HLA-G) transgeničnih embrija. Preostale tri skupine pseudogavidnih ženki izražavale su HLA-G. Dvije od njih bile su ženke dobivene u transfekciji dviju HLA-G transgeničnih linija od 5.7kb. Treću skupinu činile su ženke transgenične za HLA-A2/G. Ovaj transfekcijski ulomak je hibridni gen razreda I MHC dobiven zamjenom 5' postranične regije, prvoga eksona i ranoga prvog introna HLA-G sa istim elementima HLA-A. Uzorak izražavanja ovoga transgena isti je kao za klasične gene razreda I MHC (214). Za izolaciju DNK (iz embrija) i RNK (iz neembrijskih tkiva) životinje su žrtvovane 12.5 dana po začeću. U uzorcima DNK i RNK ispitivana je nazočnost, cjelovitost i izražavanje transgeničnog ulomka. Za dobivanje tkiva odabran je upravo 12.5 dan po začeću, jer se pretpostavljalo da će se tako izbjeći odbacivanje nesrodnih molekula razreda I, a i stoga što se u toj gestacijskoj dobi dobro mogu odvojiti embrijska od vanembrijskih tkiva. U jednostanične embrije miša injiciran je 6.0kb HindIII HLA-G ulomak, koji je u svemu jednak ulomku od 5.7kb, osim dodatnih 244bp (bp-parovi baza od engl. base pairs) koje pripadaju 5' postraničnoj regiji. Tih dodatnih 244bp smješteno je unutar 1kb 5' od eksona 1, dalje uzvodno prema 5' od bilo kojega do sada poznatog regulacijskog elementa za HLA gene, pa se nije očekivalo da će utjecati na uzorak izražavanja transgeničnog ulomka. Ustvrdivši međutim da u nekoliko slučajeva vanembrijska tkiva iz životinja transfeciranih sa ulomkom od 6.0kb imaju veliku količinu mRNK za HLA-G, pojavila se je mogućnost da upravo tih dodatnih 244bp sadrže pozitivan regulacijski element. Većina embrija transfeciranih sa ulomkom od 6.0kb imala je veliku količinu mRNK za HLA-G, što je bilo viđeno za samo jedan embrij transfeciran sa ulomkom od 5.7kb. Razlika u količini mRNK za HLA-G nije se mogla

pripisati genotipu pseudogavidnih ženki - primateljica transgeničnih embrija. Prema ovim rezultatima, ulomak od 244bp dobiven HindIII/EcoRI razgradnjom HLA-G 5' postranične regije smještene unutar 1kb 5' od eksona 1 sadrži pozitivan regulacijski element. Pokusom privremene transfekcije JEG-3 humanih koriokarcinomskih stanica pokazalo se da regija od 244bp ne može izazvati neposredno prepisivanje CAT reporter gena iz heterolognog promotora (214). Dakle, ovo područje ne sadrži čitav pojačivački element, ali je moguće da sadrži pojačivač prekinut EcoRI restrikcijskim mjestom. Druga je mogućnost da regija od 244bp sadrži regiju kontrole locusa - LCR (engl. locus control region) ili regiju za vezivanje za matriks - MAR (engl. matrix attachment region). Ove regulacijske regije mogu ispoljavati svoj učinak jedino kada je ispitivani gen umetnut u genom (215). Potom je izvršen nastavak sekvencioniranja 5' postranične regije HLA-G, kako bi se uključio i ulomak od 244bp (233). Usporedbom ove regije sa poznatim LCR i MAR regijama utvrđena je velika sličnost sa HS3 regijom b-globinskog LCR (232). Obje ove regije imaju središnji dio bogat TA bazama okružen gotovo simetričnim GGTGG kutijama i obje sadrže AP-1 vezno mjesto. HS3 regija b-globinske LCR je najvažniji dio te LCR tijekom hematopoeze u fetusa (60). Moguće je da element koji je zajednički za b-globinsku HS3 regiju i 244bp regiju HLA-G ima opću važnost u regulaciji prepisivanja gena u tkivima fetusa.

Tijekom proizvodnje matičnih transgeničnih embrija pokazalo se da korištenje ulomka od 6.0kb dovodi do visokog nivoa izražavanja transgeničnoga ulomka 12.5 dana po začeću. Stoga je ova transgenična linija korištena u nadi da će se postići slična razina izražavanja (233). Tri transgenične linije miševa nosile su čitav ulomak od 6.0kb. Sve tri linije pokazivale su isti uzorak izražavanja transgena u vanembrijskim tkivima. Najviša razina mRNK za HLA-G utvrđena je 10.5 i 12.5 dana po začeću u posteljici i parijetalnoj žumanjčanoj vreći, a u visceralnoj žumanjčanoj vreći i amnionu na termin porođaja, što odgovara dinamici izražavanja HLA-G u

humanim tkivima. Ona linija koja je sadržavala najveći broj kopija transgena pokazivala je razinu izražavanja u vanembrijskim tkivima jednaku ili veću nego u humanim vanembrijskim tkivima. Na posteljicama iz te mišje linije učinjena je *in situ* hibridizacija, koja je pokazala smještaj mRNK za HLA-G u spongiotrofoblastu, koji odgovara HLA-G<sup>+</sup> citotrofoblastu u ljudskome zametku. U ranoj trudnoći spongiotrofoblast je odvojen od decidue jednim slojem gigantskih stanica trofoblasta koji nestaje oko 13.5 dana po začeću (96). Dakle, sredinom trudnoće u miša stanice spongiotrofoblasta koje izražavaju HLA-G dolaze u neposredan dodir sa deciduom majke.

Izražavanje HLA-G u tkivima odraslih transgeničnih miševa odgovara njegovu izražavanju u tkivima odraslih ljudi. RT-PCR-om niska razina mRNK za HLA-G može se dokazati u mozgu, oku, timusu, slezeni i spolnim žlijezdama. U mozgu i oku veća je količina alternativno spliced oblika mRNK za HLA-G, dok se u timusu i vanembrijskim tkivima nađe više mRNK za HLA-G pune dužine. Imunohistološke studije upućuju na nazočnost HLA-G u keratinocitima transgeničnih životinja (233)

### **2.1.3.3. Tolerancija HLA-G antigena u transgeničnih miševa za HLA-G**

Razina izražavanja HLA-G u humanome timusu je niska. To je dovelo u pitanje učinkovitost timusnog obrazovanja limfocita T i posljedične tolerancije na HLA-G. Razina izražavanja HLA-G u transgeničnim tkivima je niska, a čini se da je ograničena na dendritičke stanice. Istovremenim imunohistokemijskim obilježavanjem timusa životinja transgeničnih za ulomak od 6.0kb protutijelom za dendritičke stanice i monomorfne determinante molekula razreda I MHC dobije se bojanje molekula razreda I MHC jedino na onim stanicama koje vežu i mPt za dendritičke stanice. Smještaj HLA-G u dendritičkim stanicama timusa upućuje na moguć razvitak timusne tolerancije. Kako bi se provjerila mogućnost uspostave tolerancije

izvršeni su pokusi transplantacije kože HLA-G transgeničnim miševima, ali najprije je bilo potrebno utvrditi mogu li ne-transgenični miševi uopće prepoznati HLA-G kao strani antigen. Od 19 kožnih kalema porijeklom od HLA-A2/G transgeničnih miševa transplantiranih ne-transgeničnim primateljima, odbačeno je njih 18, a jedan je primatelj uginuo prije no što je moglo nastupiti odbacivanje. Suprotno tome, 17 od 18 ne-transgeničnih presadaka transplantiranih HLA-A2/G transgeničnim primateljima bilo je prihvaćeno. Jedan presadak nije bio odbačen, nego je primatelj uginuo. Isto su tako bila prihvaćena sva četiri ne-transgenična presatka od strane ne-transgeničnih primatelja i dva HLA-A2/G transgenična presatka od strane transgeničnih primatelja. Sa splenocitima ne-transgeničnih primatelja HLA-A2/G transgenične kože izvršen je test limfocitotoksičnosti (CTL test). Kroz sedam dana splenociti su poticani sa mitomicinom zakočenim splenocitima HLA-A2/G transgeničnih životinja. Splenociti primatelja presatka lizirali su HLA-A2/G transgenične B limfoblaste bez obzira na njihov H-2 haplotip, mada je učinkovitija bila liza ciljnih stanica haplotipa identičnoga efektorskim stanicama (233). Ovim pokusima dokazalo se da ne-transgenični miševi mogu prepoznati HLA-G bilo kao strani MHC antigen, bilo kao strani HLA-G peptid u sklopu vlastitih H-2 molekula. Da bi se procjenila razina tolerancije na HLA-G u miševa transgeničnih za HLA-G, njima je presađena HLA-A2/G transgenična koža. Svih 11 kožnih presadaka bilo je dugoročno prihvaćeno. U svrhu kontrole, 16 takovih presadaka transplantirano je ne-transgeničnim primateljima i 15 ih je bilo odbačeno, a jedan je primatelj prerano uginuo. Znači, miševi transgenični za HLA-G tolerantni su za čitavu HLA-G membransku bjelančevinu i za HLA-G peptide predstavljene u sklopu H-2 molekula. Prepoznavanje HLA-G od strane ne-transgeničnih miševa ukazuje na imunološku sličnost HLA-G drugim mišjim i humanim antigenima razreda I MHC, odnosno HLA-G može biti prepoznat od strane limfocita koji prepoznaju promijenjeno vlastito. Tolerancija na HLA-G u miševa transgeničnih za HLA-G pokazuje da je moguće potaknuti toleranciju za HLA-G membranske bjelančevine i

za HLA-G peptide predstavljene u sklopu vlastitih H-2 molekula. Vjerojatno je proces tolerancije potaknut negativnom selekcijom tijekom koje se uključuju timusne dendritičke stanice, mada je to još uvijek samo hipoteza. Nepoznato je da li repertoire limfocita u miševa transgeničnih za HLA-G prolazi pozitivnu selekciju onih limfocita koji mogu prepoznati HLA-G molekule koje nose strane peptide (233).

#### **2.1.3.4. Mehanizmi regulacije izražavanja antigena razreda I MHC sustava na stanicama trofoblata**

Pokusi transfekcije nekласičnih MHC gena razreda I pokazali su da mRNA za HLA-E i HLA-F sadrže različite stanice u toku embriogeneze, dok se HLA-G dokazuje samo na ekstraembrionalnom tkivu (93). Transfekcijom HLA-G gena dolazi do ekspresije površinske molekule od 39 kD, koja pokazuje određenu homologiju sa "klasičnim" antigenima razreda I. Naime, usporedbom sekvence aminokiselina HLA-G sa ostalim antigenima razreda I nije nađena veća strukturna razlika izvanstaničnog dijela molekule. Iako postoje zamjene nekih aminokiselina (osobito u alfa-2 domeni), ne može se utvrditi da li te zamjene dovode do nesposobnosti HLA-G da veže i predočava peptide. Rentgenskom kristalografijom utvrđeno je da HLA-G ima intaktne regije, koje se smatraju odgovornima za interakciju molekule razreda I i CD8 molekule (208). Upotrebom limfoblastičnih stanica, koje su HLA negativne, a transfektanti su za HLA-G, utvrđeno je da NK citolitička aktivnost opada razmjerno ekspresiji HLA-G (91). Ekspresija HLA-G antigena na stanicama trofoblata tijekom normalne embriogeneze mijenja se na način da razina ekspresije opada kako trudnoća napreduje prema terminu poroda (93). Imunohistokemijskim metodama dokazano je postojanje dvije subpopulacije trofoblata prema HLA antigenskoj ekspresiji: 1) vilozni trofoblast (citotrofoblast i sinciciotrofoblast) koji ne eksprimira antigene razreda I HLA (negativan) i

2) ekstravilozni trofoblast koji eksprimira antigene razreda I HLA (pozitivan). Neka istraživanja pokazala su da vilozni citotrofoblast može sadržavati mRNA za antigene razreda I HLA, a da nema ekspresije antigena razreda I HLA na površini stanice. Tako vilozni trofoblast, također, možemo podijeliti u dvije subpopulacije: 1a) vilozni sinciotrofoblast koji je mRNA negativan i protein negativan za antigene razreda I HLA i 1b) vilozni citotrofoblast mRNA pozitivan, a protein negativan (139). Još uvijek nedovoljno poznajemo mehanizme koji reguliraju ekspresiju antigena razreda I HLA na trofoblastnim stanicama. Smatra se da postoje tri tipa regulacije. Prvo, u stanicama sinciotrofoblasta spriječena je transkripcija svih gena razreda I MHC. Drugo, u viloznom citotrofoblastu postoji kontrola translacije, pa te stanice u prvom trimestru trudnoće sadrže mRNA za HLA-G, ali ne ekspimiraju mjerljivu razinu proteina (260,90). Treće, u vanjskim citotrofoblastnim stanicama vrši se selekcija samo HLA-G gena za transkripciju i translaciju (93). O uplivu citokina na regulaciju ekspresije antigena razreda I HLA saznanja su veoma oskudna. Zna se da IFN-gama pojačava ekspresiju svih antigena razreda I HLA, dok IFN-alfa nema utjecaja na ekspresiju tih antigena (139). Smatra se da regulacija ekspresije antigena glavnog kompleksa tkivne podudarnosti na stanicama trofoblasta, koje su u kontaktu sa majčinom krvi na jednoj strani i fetalnom krvi i tkivima na drugoj strani, igra glavnu ulogu u održavanju trudnoće.

## 2.2 ULOGA CITOKINA I HORMONA U POSTELJICI

Cikličke hormonske promjene estrogena i progesterona koje dovode do ovulacije jajne stanice, implantacije blastociste i placentacije, imaju bitan učinak i na dinamiku promjena imunokompetentnih stanica, kao i na sposobnost različitih stanica da luče citokine. Uterini epitel je prvi prepoznat kao tkivo koje luči citokine, koji igraju važnu ulogu komunikacije između stanica. To je izuzetno važno u posteljici gdje postoji heterogenost stanica koja je upravo jedinstvena zbog nazočnosti fetusnih i majčinih stanica, koje mogu biti limfatičnoga i ne-limfatičnoga porijekla. U takovome okruženju citokinska mreža može pomoći pri izmjeni i preradi informacija. Ove je procese teško promatrati izdvojeno, upravo zbog velikoga broja citokina i djelomičnog preklapanja njihovih učinaka. Zato će ovdje biti navedene osnovne činjenice o osobinama citokina u posteljici - odakle se luče, kako se vežu za ciljnu stanicu, kako je posredovana njihova funkcija.

Naziv citokini potječe od Cohena, a odnosi se na topive posrednike koje proizvode limfatične i ne-limfatične stanice, i koji posreduju specifične učinke na ciljnim stanicama (38). Kasnije je ova definicija proširena, i po njoj su citokini topivi (gliko)proteinski proizvodi stanica koji neenzimskom aktivnošću reguliraju funkcije stanica (162). Većina citokina djeluje lokalno, na parakrini i autokrini način, dok neki ostvaruju endokrine učinke i na udaljenim tkivima. Po otkriću, većina citokina definirana je prema njihovome lučenju od strane jedne grupe stanica, ili pak prema učincima na neku određenu vrstu stanica, da bi kasnije postalo očito da veliki broj citokina luči više vrsta stanica, a njihova se aktivnost može ostvarivati na različitim tkivima i organima. Također raste broj dokaza o tome kako nije ispravno definirati citokine prema njihovim učincima na pojedinu stanicu, jer oni ostvaruju svoje različite aktivnosti kao sastavnice "citokinske mreže".



### 2.2.1 Glavna obilježja

Među prvo otkrivenim citokinima koji se luče u posteljici tijekom trudnoće bli su CSF-1 (engl. colony stimulating factor) (40); TNF-beta1 (engl. tumor necrosis factor) (237); TNF-alfa (engl. tumor necrosis factor alfa) (262); GM-CSF (engl. macrophage-monocyte colony stimulating factor) (177); IL-6 (interleukin-6) (196) i LIF (engl. leukemia inhibitory factor) (6g). Danas je poznat cijeli niz citokina, i njihovih osobina, koji se luče u posteljici. Ovdje će biti navedena neke od glavnih saznanja o njima.

**Interleukin 1 (IL-1).** Fiziološko izvorište IL-1 su mononuklearni fagociti. Njegovo lučenje dokazano je u monocita periferne krvi, pluća, peritoneuma, jetre, slezene i koštane srži. Osim monocita, IL-1 još luče i keratinociti, glia stanice i endotelne stanice. Proizvodnja IL-1 regulirana je kako na razini prepisivanja tako i na razini prevođenja. Tijekom normalne trudnoće decidualizirani endometrij i placentne opne proizvode IL-1b. Tijekom prvoga tromjesečja normalne trudnoće značajno poraste količina imunoreaktivnoga IL-1 $\beta$  i mRNK za IL-1 $\beta$ , u usporedbi sa normalnim menstruacijskim ciklusom. Ovaj nalaz govorio bi u prilog regulacije proizvodnje IL-1 $\beta$  na razini prepisivanja. Proučavanja na drugim vrstama stanica pokazala su da se prepisivanje mRNK za IL-1 $\beta$  pospješuje smanjenjem učinka represorskih genskih čimbenika (56). Prevođenje poruke za IL-1 $\beta$  može se smanjiti cikličkim adenzin-monofosfatom čija je proizvodnja potaknuta prostaglandinima, a povećati kalcijском ionoforom i lipooksigenaznim metaboličkim putem arahidonske kiseline (47).

**Interleukin 2 (IL-2).** IL-2 aktivira stanice imunoga sustava, osobito citotoksičnih limfocita T, i stimulira aktivnost NK-stanica (169). Imunološka tolerancija odnosi se na odsustvo specifičnih protutijela u odgovoru na neke epitope u inače imunokompetentnih životinja. Drži se da IL-2 ima važnu ulogu u razvitku tolerancije na određene antigenske determinante.

**Interleukin 3 (IL-3).** IL-3 proizvode aktivirani limfociti T. Gen koji kodira IL-3 nalazi se na dugome kraku kromosoma 5 na crti q23-31, u

zajednici sa genima za druge čimbenike rasta, uključujući GM-CSF (čimbenik rasta granulocitno-monocitnih kolonija, prema engl. granulocyte-monocyte colony stimulating factor), M-CSF (čimbenik rasta monocitnih kolonija, prema engl. monocyte colony stimulating factor), IL-4, IL-5 i genom za receptor za M-CSF (176,182).

**Interleukin 4 (IL-4).** IL-4 prvo je izoliran iz mišjih klonova limfocita T koji su mogli podržavati umnožavanje mastocita, a bjelančevina iz nadtaloga tih klonova poticala je T-stanice. IL-4 pojačava izražavanje MHC antigena razreda II na limfocitima B, monocitima i makrofagima (134). Receptori za IL-4 izraženi su na mnogim vrstama stanica, uključujući hematopoetske stanice i stromalne stanice u koštanoj srži (181). IL-4 potiče prekapćanje imunoglobulinskih razreda u pravcu proizvodnje imunoglobulina E (IgE).

**Interleukin 5 (IL-5).** U ljudi IL-5 podržava kulture prethodnica stanične linije eozinofila (264), potiče rast i usmjeravanje potaknutih limfocita B, pspješujući proizvodnju IgA. Usprkos srodnosti sa interferonom  $\gamma$  i GM-CSF, IL-5 veže se za svoj posebni membranski receptor (239).

**Interleukin 6 (IL-6).** U čovjeka stanice trofoblasta luče IL-6 i izražavaju membranski receptor za IL-6. Pokazano je da IL-6 potiče proizvodnju humanog korionskog gonadotropina (hCG) u kulturama trofoblasta, što ukazuje na autokrini mehanizam kojim IL-6 utječe na razinu hCG-a (157). Nadalje, IL-6 potiče sazrijevanje limfocita B u plazma-stanice, pojačava fagocitozu i izražavanje receptora na makrofagima. *In vitro*, korion i decidua imaju urođenu sposobnost proizvodnje IL-6, a upalni citokini tu proizvodnju mogu pojačati (49,50).

**Interleukin 7 (IL-7).** IL-7 je dobiven pročišćavanjem nadtaloga kulture promijenjenih stromalnih stanica koštane srži koji je podržavao rast limfocita (130,161). Daljnji rezultati pokazali su da IL-7 osim poticanja diobe normalnih limfocita B u ranim stadijima usmjeravanja, može također poticati umnožavanje timocita u odsustvu mitogena kao što je

fitohemaglutinin (PHA) i pojačati mitogenski učinak PHA na timocite i zrele limfocite T.

**Interleukin 8 (IL-8).** IL-8 potiče kemotaksiju neutrofila i limfocita T, koji su dva do deset puta osjetljiviji na taj kemotaksijski učinak (127). Učinci IL-8 potkrepljuju pretpostavku da se ovaj citokin izlučuje kao odgovor na IL-1 proizveden na mjestu odvijanja reakcija kasne preosjetljivosti, unovačujući limfocite T i započinjući tako imunološki posredovan upalni odgovor. Mada i neimune stanice pokazuju stalnu razinu izražavanja mRNK za IL-8, one ne mogu odgovoriti na podražaj lipopolisaharidom (LPS), što je pokazano za primarne izolate epitelnih stanica i fibroblasta, kao i za stanične linije istoga porijekla. Plućni fibroblasti čovjeka nisu bili u stanju pojačati izražavanje mRNK za IL-8, niti izlučiti IL-8 niti nakon izlaganja LPS-u u širokom rasponu doza od 100pg-10mg/ml. Ove iste stanice pokazale su značajno povećano izražavanje mRNK za IL-8 nakon izlaganja fiziološkim dozama TNF- $\alpha$  ili IL-1. Ovi rezultati govore da za lučenje IL-8 neimune stanice trebaju aktivaciju upalnih stanica domaćina, koje će i sa svoje strane izlučiti poticajne citokine, npr. IL-1 ili TNF. Nakon aktivacije primarnoga odgovora mnoge će stanice, u kaskadnoj reakciji, započeti sa lučenjem IL-8. Ovo pokazuje da se i stanice koje su se donedavno smatrale "nevinim promatračima" ili pak ciljnim stanicama upalnoga odgovora moraju također promatrati kao efektori upalne reakcije (148). U širokom rasponu doza (10pg/ml-10ng/ml) IL-4 regulira temeljnu razinu izražavanja mRNK za IL-8 nakon podražaja LPS-om ili IL-1. Ovaj se učinak IL-4 ostvaruje kočenjem *de novo* sinteze bjelančevina, pošto cikloheksimid ukida potiskujući učinak IL-4 na izražavanje mRNK za IL-8 (148). Vjerojatno je upravo to način na koji IL-4 proizveden lokalno u tkivu, ili pak u limfocitima privučenima na mjesto upalne reakcije potiskuje proizvodnju velikih količina IL-8 i osigurava mehanizam kojime se može promijeniti sastav upalnih stanica od pretežno neutrofilnog infiltrata do infiltrata koji sadrži raznolike mononuklearne stanice.

**Interleukin 9 (IL-9).** IL-9 je ljudski homolog mišjeg P40. Taj glikoprotein podržava rast nekih klonova pomoćničkih limfocita T u odsustvu antigena ili stanica koje predstavljaju antigene mehanizmima koji nisu srodni djelovanju IL-2 i IL-4 (246). IL-9 luče pretežno Th2 stanice nakon aktivacije konkanavalinom A (ConA) ili antigenom (216).

**Interleukin 10 (IL-10).** Ovaj citokin proizvode klonovi Th2 stanica koji sprečavaju sintezu citokina od strane Th1 stanica potaknutu makrofagima ili stanicama koje predstavljaju antigen (152). Kasnije je pokazano da IL-10 posreduje brojne učinke na drugim vrstama stanica, kao i da ga mogu lučiti različite vrste stanica. IL-10 djeluje na stanice koje predstavljaju antigen tako da ove prestanu poticati lučenje citokina u Th1 stanica (57).

**Interleukin 11 (IL-11).** IL-11 potiče umnožavanje plazmocitoma, potiče razvoj limfocita B ovisan o limfocitima T i udružuje svoje djelovanje sa IL-3 u poticanju tvorbe mišjih i ljudskih megakariocitnih kolonija (20,183).

**Interleukin 12 (IL-12).** IL-12 ima djelovanje srodno IL-2 u poticanju stvaranja CTL i LAK stanica. Građen je kao heterodimer od 75kDa. Podjedinice od po 25 i 40kDa povezane su disulfidnim mostovima (74,229).

**Interleukin 13 (IL-13)** IL-13 je član citokinske obitelji čiji se geni mapiraju na kromosomu 5 (224). Po biološkim osobinama sličan je IL-4. Tako potiče ispoljavanje MHC antigena razreda II i CD23 molekule na limfocitima B, te sudjeluje u proizvodnji imunoglobulina razreda E (19).

**Interleukin 14 (IL-14)** Prema biološkom učinku isprva je nazvan činbenikom rasta limfocita B. Osim aktiviranih limfocita B mRNA za IL-14, kao i njegov receptor konstitutivno ispoljavaju limfomi čije je porijeklo u B limfocitnoj lozi. Stoga mu se pripisuju autokrine i parakrine funkcije u rastu normalnih ali i zloćudno promijenjenih limfocita B (59)

**Interleukin 15 (IL-15)** Geni za IL-15 mapira se na kromosomu 4 (3). IL-15 se veže za b i g lance receptora za IL-2 (66), pa mu vjerojatno zbog toga mnogi biološki učinci poklapaju sa IL-2. Vezanjem za p75 ( $\beta$ )

lanac receptora za IL-2 snažno potiče NK-aktivnost limfocita urođenih ubojica koji na svojoj membrani nose CD56 antigen (28)

*Čimbenik nekroze tumora alfa* (TNF $\alpha$ ). Nazočnost biološki aktivnog TNFa dokazana je u ljudskoj decidui, amnionskoj tekućini i nadtalozima tkiva posteljice i decidue. Doda li se tome još i nalaz receptora za TNF na stanicama posteljice i mRNK za TNF $\alpha$  u stanicama maternice, TNF $\alpha$  dobiva ulogu ključnoga citokina u trudnoći (29,51). Mnoge promjene koje se dešavaju u endometriju čovjeka nalikuju upalnim i reparacijskim procesima. Izražavanje receptora za citokine na stanicama endometrija, njihova proizvodnja od strane tih istih stanica i upravljanje funkcijama endometrija tim čimbenicima upućuju na potencijal citokina da djeluju na autokrinu, parakrinu i endokrinu razinu u endometriju čovjeka.

*Čimbenik inhibicije leukemija* (LIF, eng. *leukemia inhibitory factor*) Endometrijske žlijezde jedno su od najvažnijih mjesta proizvodnje LIF-a. Prvotno se mislilo da LIF koči razvoj embrijskih matičnih stanica u miša (230). Potom se je uočilo da u miševa sa mutiranim genom za LIF je onemogućena implantacija blastociste u stijenku maternice (230)

Tijekom menstruaacijskog ciklusa žene količina LIF-a se mijenja. Najveća količina uočena je u srednjoj i kasnoj luteinskoj fazi. Nazočan je i u prvom tromjesječju trudnoće u decidui ali u malim količinama (8). Tehnikom RT-PCR pokazano je izražavanje gp130 (receptor koji sprovodi signale IL-6 i LIF-a) na stanicama trofoblata. Tim putem LIF potiče proizvodnju korionskog gonadotropina u stanicama trofoblata (211). Nadalje LIF potiče transformaciju citotrofoblata u sinciotrofoblast (210) U suradnji sa EGF-om, LIF potiče proizvodnju aktivatora tipa (uPA), kao i gelatinaze B i matriksne metaloproteinaze p (MMP9) u stanicama blastociste miša, enzima koji se smatraju važima u implantaciji blastociste u stijenku maternice (230).

### 2.2.2. Način ostvarivanja učinaka

Citokini svoje učinke ostvaruju preko svojih receptora. Citokinski receptori nalaze se na mnogim vrstama stanica, a biološka aktivnost citokina unutar citokinske mreže posredovana je upravo njihovim membranskim receptorima. Vezanjem citokina za citokinski receptor stvara se drugi glasnik koji daje stanici sposobnost da odgovori na vanjske podražaje. Citoplazmatska domena receptora u načelu služi za prenošenje učinka vezanja liganda na unutarstanične metaboličke puteve. Aktivacija enzima (npr. tirozin-kinaze), koja čini sastavnicu citoplazmatske domene, vjerojatno predstavlja prvi stanični odgovor koji uslijedi nakon vezanja citokina za receptor. Poznato je da receptorske molekule koje niskom sklonošću vežu GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, eritropoetin i G-CSF pripadaju istoj obitelji receptora za čimbenike rasta, koja još uključuje receptore za hormon rasta, prolaktin, ciliarni neurotropni hormon, leukemija inhibicijski čimbenik i protoonkogen c-mpl (42,10). Tirozin-kinaza i B lanac ne mogu samostalno vezati čimbenik rasta, ali ove molekule prevode niskoafinitetni u visokoafinitetni receptor fizičkim udruživanjem sa kompleksom receptor-ligand.

Ovaj model može objasniti očividnu unakrsnu reaktivnost liganda, kao i preklapanja u funkciji između različitih citokina. Moguće je da se vezanjem jednoga čimbenika iskoriste svi raspoloživi B lanci i na taj način onemogućiti tvorba visokoafinitetnih receptora za druge ligande koja bi uslijedila nakon njihovoga vezivanja za odgovarajući A lanac. To bi predstavljalo model recipročnog ili unakrsnog natjecanja pri tvorbi visokoafinitetnog receptora, čiji bi ishod ovisio o relativnome afinitetu svakoga od A lanaca za zajednički B lanac (166).

Već smo naveli da je osnova prenosa signala u stanicu vezanje citokina za specifični receptor. Međudjelovanje citokina i receptora uzrokuje konformacijsku preobrazbu unutar receptora što potiče daljnje sprovođenje signala uz pomoć drugoga glasnika, malih molekula i iona koji difundiraju citoplazmom i šire signal kroz stanicu. Bjelančevine koje čine

sprovodni put su G (gvanin-nukleotid) regulacijske bjelančevine. G-bjelančevine aktiviraju enzim na unutrašnjoj površini stanične membrane koji će pretvoriti prethodničku molekulu u aktivnog drugog glasnika. On tada može djelovati neposredno na stanične bjelančevine uzrokujući njihovu aktivaciju, ili češće, može aktivirati naredni enzim, protein-kinazu, koja fosforilirajući bjelančevine mijenja njihovu konformaciju i tako ih potiče na aktivnost.

Poznata su barem dva glavna puta. Prvo je opisan put u kojem je drugi glasnik ciklički adenzin-monofosfat (cAMP). U drugome, fosfatidilinozitol-fosfatnome (PIP) putu, sudjeluju ioni Ca, inozitol-trifosfat i diacilglicerol.

Aktivacijom puta cAMP-a može se postići poticanje ili potiskivanje aktivnosti, ovisno o podraživanju poticajnih ili potiskujućih receptora, odnosno aktivaciji odgovarajućih G bjelančevina - stimulacijskih (Gs) ili inhibicijskih (Gi). Sprovođenje signala aktivira adenilat-ciklazu, koja potom pretvara ATP u cAMP. Ciklički AMP, sa svoje strane aktivira protein-kinazu-A.

Put PIP-a je pretežno poticajan put. Sprovođenje signala G bjelančevinama dovodi do aktivacije fosfolipaze koja pretvara fosfatidilinozitol-4, 5-difosfat u diacilglicerol (DAG) i inozitol-trifosfat (IP3). IP3 pokreće kalcijske ione pohranjene u endoplazmatskoj mrežici koji se vežu za bjelančevinu kalmodulin i potom mogu aktivirati protein-kinaze. DAG ostaje u membrani i može aktivirati stanične bjelančevine preko protein-kinaze-C.

Rezultati novijih radova ističu značaj modela u kojima receptori potiču višeznačne signalne kaskade udružujući se sa jednom ili više podjedinica. Na taj je način moguće objasniti iste ili slične učinke posredovane različitim čimbenicima rasta (148).

### 2.2.3. Citokini u trudnoći-regulacija njihovog lučenja

Mišja decidua obiluje citokinima. Uglavnom su to čimbenici rasta koji pripadaju urođenom imunom sustavu, kao što su CSF-1 (čimbenik stimulacije kolonija 1, prema engl. colony stimulating factor 1), (7), GM-CSF (9), i  $TGF\beta_2$  (transformirajući čimbenik rasta beta 2, prema engl. transforming growth factor) (36). Proizvodi limfocita T, kao što su IL-2 i IL-4 nemaju značajnu ulogu tijekom normalne trudnoće u miša. U decidui rane trudnoće u čovjeka nalazi se značajan broj imunih efektorskih stanica, koje ipak ne djeluju citotoksično u mikrokolišu decidue. Zacijelo postoji više mehanizama koji nadziru imuni odgovor u decidui. Decidualne stanice prvoga tromjesečja proizvode značajne količine prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) (180).  $PGE_2$  može spriječiti aktivaciju limfocita T i proizvodnju IL-2, a u nekih populacija limfocita T pospješuje izlučivanje GM-CSF. Nadalje, decidualne stanice proizvode bjelančevine koje mijenjaju aktivnost stanica posrednica adaptivne imunosti, kao što je  $TGF\beta_2$ .  $TGF\beta_2$  potiskuje funkcije limfocita T, uključujući i proizvodnju citokina (36).

Vjerojatno ipak najdramatičniju prilagodbu tijela majke na trudnoću predstavlja promjena u endokrinome sustavu. Steroidni hormoni, osim što su neophodni u održavanju trudnoće, imaju i učinke u regulaciji funkcija limfocita T i B kao i regulaciji lučenja citokina. Na ovariektomiranim životinjama dokazano je da steroidni hormoni sudjeluju u regulaciji lučenja citokina. Tako je estrogen potreban za sintezu GM-CSF, što je dokazano praćenjem razine GM-CSF, koja je bila najviša na dan ovulacije, a tu visoku razinu se mogalo inhibirati s antagonistom estrogena, dok antagonist progesterona nije imao utjecaja. Estrogen pojačava aktivnost 1,25-dehidrokolekalciferola koji koči proizvodnju IL-2 u aktiviranim limfocitima. Štoviše, u decidui je visoka aktivnost enzima 1 $\alpha$ -hidroksilaze (45), koji pretvara relativno slabo aktivni 25-kolekalciferol u visoko aktivni 1,25-dihidrokkolekalciferol. U trudnoći je povišena i razina cirkulirajućih



glukokortikoida, pa se i putem ovoga mehanizma može očekivati smanjenje lučenja IL-2 i moguće poticanje IL-4.

Razina progesterona također značajno poraste u trudnoći. Do sada nisu dokazani učinci progesterona na lučenje citokina od strane limfocita T, ali on potiskuje aktivnost NK stanica (235). Naime, progesteron potiče proizvodnju bjelančevine nazvane blokirajući čimbenik potaknut progesteronom (PIBF, prema eng. progesterone induced blocking factor) koji je u stanju zakočiti citotoksičnu aktivnost limfocita periferne krvi. Ti imunoregulacijski učinci progesterona direkto su ovisni o nazočnosti i afinitetu progesteronskih receptora u limfocitima (235).

U regulaciji sinteze LIF-a sinergistički sudjeluju progesteron i estrogen (14). Razina LIF-a poraste četvrtog dana trudnoće, upravo pred implantaciju blastociste. Sinteza CSF-1 ovisna je također o kombinaciji djelovanja estrogena i progesterona. Značajnija razina otkriva se tek trećeg dana trudnoće, a maksimalnu koncentraciju doseže 14-15-tog dana trudnoće. CSF-1 potiče decidualizaciju (40). mRNA za TGF-beta1 dokazana je u luminalnom i žljezdanom epitelu gravidnog uterusa miša u preimplantacijskom i peri-implantacijskom razdoblju. mRNA za TGF-alfa značajno više se eksprimira u uterinom epitelu, kroz sve stadije trudnoće, u odnosu na epitel negravidnog uterusa. Mjerljiva razina javlja se 5. dana, a maksimum intenziteta je 15. dan. U sintezi citokina, od strane epitelnih stanica sudjeluju specifični hormonski i citokinski kontrolni mehanizmi. Steroidni hormoni, kako je već rečeno, sudjeluju u sintezi CSF-1, GM-CSF i LIF-a tako što direktno kontroliraju transkripciju ovih faktora. IFN-gama inhibira GM-CSF sintezu u epitelnim stanicama uterusa (197).

Nedvojbeno je da su hormoni neophodni za održavanje trudnoće, dok njihova uloga u imunoregulaciji putem regulacije lučenja citokina u posteljici još nije u potpunosti procjenjena.

### 2.3. DECIDUALNO TKIVO

Implantacijom blastociste u hormonski promijenjenu maternicu započinje niz promijena endometrija koje se nazivaju "decidualna reakcija". Radi se o proliferaciji stromalnih stanica koje postaju bogate glikogenom. Tako promijenjen endometrij maternice naziva se decidua. U humanoj decidui, uz stromalne stanice, nalazi se veliki broj decidualnih leukocita (H22), dok su u decidui laboratorijskih glodavaca prisutne i žljezdane stanice (eng. metrial gland cells) (12).

#### 2.3.1. Imunokompetentne stanice humane decidue prvog tromjesječja trudnoće

Brojna imunohistološka istraživanja, te fenotipizacije pomoću protočnog citometra svakodnevno upotpunjuju sliku o složenosti staničnog sastava decidue. Tri glavne leukocitne populacije humane decidue jesu: makrofogi, limfociti T i NK-veliki granulirani limfociti.

##### 2.3.1.1. Makrofagi

Veliki dio stanične populacije humane decidue čine stanice porijeklom iz koštane srži. Dobar udio u toj populaciji čine makrofagi, CD14 pozitivne stanice. U glodavaca prisutni su od prvog dana gestacije, već u preimplantacijskom razdoblju, a njihov broj znatno poraste četvrtog dana gestacije, neposredno pred implantaciju blastociste (171). Osim u endometriju, oko zametka, ove stanice su opisane i u miometriju oko velikih krvnih žila i između dva sloja mišićnih niti, što ukazuje da u uterus stižu krvnom cirkulacijom (171). U humanoj decidui ove stanice eksprimiraju antigene razreda II glavnog sustava tkivne podudarnosti, uz prevladavajuću zastupljenost HLA-DR antigena, dok manji broj pokazuje antigene HLA-DP i DQ (171). Mnogi endometrijski makrofogi eksprimiraju

CD14, CD68, CD11c, a manji je udio onih koji eksprimiraju CD11b antigen (192). Nađena je i populacija CD1 pozitivnih stanica, za koje se pretpostavlja da mogu igrati važnu ulogu u prezentaciji antigena (171). Vjerojatno je da decidualni makrofagi mogu igrati gotovo sve funkcije koje se inače pripisuju makrofagima. Tako većina makrofaga bazalne decidue eksprimira makrofagni površinski antigen RM3/1 (156), a moguća uloga RM3/1 pozitivnih makrofoga u decidui je inhibicija specifičnog imunološkog prepoznavanja. Lala i suradnici (1986.) također naglašavaju imunosupresivna djelovanja makrofoga, i to putem lučenja prostaglandina E2 (119). Decidualni makrofagi također mogu igrati ulogu u rastu i diferenciranju posteljice lučenjem brojnih citokina. Od citokina makrofogi prvenstveno luče čimbenike stimulacije kolonija makrofaga i monocita (M-CSF engl. macrophage monocyte colony stimulating factor alfa) i čimbenik nekroze tumora (TNFalfa-tumor necrosis factor alfa) (170). Osim toga, ove stanice sadrže lizozomske enzime, kao što su nespecifične esteraze, kisele fosfataze i alfa-1 antiproteazu, što ih čini sposobnim za razgradnju fagocitiranog materijala (156).

#### **2.3.1.2. Limfociti T**

Klasični, CD3 pozitivni, limfociti T čine relativno malu populaciju leukocita humane decidue, koji su smješteni u funkcijskom i u bazalnom sloju endometrija. Ta dva smještaja možda ukazuju i na funkcijski različite subpopulacije limfocita (24,25). Njihov broj u funkcijskom sloju endometrija ne varira značajnije kroz menstrualni ciklus. Mijenja se jedino proporcija s ostalim imunokompetentnim stanicama poglavito zbog porasta ostalih imunokompetentnih stanica. Iste promjene videne su i u decidui(21) Većina T stanica humanog endometrija, i epitela i strome, eksprimira na svojoj površini CD8 antigen(21) i alfa/beta heterodimer T-staničnog receptora (TCR). Stanice koje nose gama/delta heterodimer TCR se vrlo rijetko nalaze u trudnoći. Negravidni endometrij i decidua ne eksprimiraju receptor

za interleukin-2 (236), što bi upućivalo na nemogućnost aktivacije T limfocita endometrija i decidue. Ipak na stanicama koje formiraju limfoidne agregate mogu se dokazati antigeni razreda II MHC i VLA antigeni (antigeni vrlo kasne aktivacije od engl. very late activation) (236), što ipak odaje mogućnost aktivacije decidualnih limfocita T. Limfociti T također mogu secernirati citokine, kao što su GM-CSF, TGF-beta i IL-3 (236,254), koji potiču rast posteljice.

### 2.3.1.3. NK stanice

Stanice prirodne ubojice - NK-stanice (prema engl. natural killer cells) predstavljaju treću populaciju limfoidnih stanica (242,124). One se značajno razlikuju od limfocita T i B po tome što ne eksprimiraju (niti rearanžiraju) poznate receptore za antigen, odnosno površinske imunoglobuline (Ig) ili CD3/TCR (T-stanični receptor, prema engl. T-cell receptor) kompleks (124). Fenotipska obilježja NK-stanica jesu membranska ekspresija receptora za IgG niskoga afiniteta (FcγRIII ili CD16) (117) i ekspresija CD56 molekule, koja je homologna sa NCAM molekulom (prema engl. neural cell adhesion molecule) (69,84,123,146,222). Za razliku od mirujućih limfocita T i B, NK-stanice su relativno velike i u citoplazmi imaju tipična azurofilna zrnca. Zbog ovih morfoloških obilježja nazivaju se i veliki granulirani limfociti - LGL (prema engl. large granular lymphocytes) (207). Sazrijevanje NK-stanica može se odvijati i bez funkcijski aktivnog timusa (82). Tako su NK-stanice nazočne i u nude miševa i u SCID miševa (prema engl. severe combined immuno-deficiency) (48,77). Za razliku od limfocita T i B, NK-stanice mogu svoju efektorsku funkciju vršiti bez prethodne *in vivo* ili *in vitro* aktivacije. Upravo zbog toga su i nazvani stanicama prirodnim ubojicama (173). Iako je glavna razlika između zrelih T i NK-stanica upravo preradba i izražavanje funkcionalnog TCR/CD3 kompleksa, ipak i NK-stanice izražavaju neke molekule CD3 kompleksa (125). Tako se CD3 $\zeta$  lanac može udruživati sa CD16 (4,5,122), CD2 (149)

ili p58 (150) molekulama. Opisano je i prepisivanje CD3ε lanca u klonskim i poliklonskim populacijama NK-stanica (15). Upotrebom protuseruma usmjerenog protiv peptidne sekvence CD3ε Lanier i sur. pokazali su nazočnost CD3ε bjelančevine u citoplazmi (121,184). Prijepisi za CD3γ i CD3δ nisu se mogli dokazati niti u mirujućim niti u aktiviranim zrelim NK-stanicama.

NK-stanice smatraju se efektorskim stanicama koje mogu lizirati tumorske ili virusom zaražene stanice putem nespecifičnih mehanizama (242). Važno je istaknuti da im se citolitički učinak i spektar antitumorske aktivnosti jako povećavaju kultivacijom sa interleukinom-2 (IL-2). NK-stanice aktivirane IL-2 predstavljaju najsnažnije efektore među svim stanicama koje se nazivaju ubojice aktivirane limfokinom (LAK, prema engl. lymphokine-activated killer cells) (242,71,72,73,83). Funkcije posredovane bilo NK- bilo LAK-stanicama smatrale su se neovisnima o sustavu glavnog kompleksa tkivne podudarnosti MHC (prema engl. major histocompatibility complex) (85). Ova definicija proizlazi iz činjenice što NK-stanice uspješno liziraju tumore koji ne izražavaju MHC antigene, kao što je to eritroleukemijska stanična linija K562, ili pak tumorske stanice koje izražavaju nepovezane MHC molekule razreda I (6,242). Upravo nemogućnost da se dokaže specifični receptor za antigen, kao i opažanje da su različite funkcije NK-stanica (npr. citolitička aktivnost, proizvodnja i lučenje citokina) posredovane svim NK-stanicama doprinjeli su stavu da funkcije NK-stanica nisu klonski raspoređene niti specifične. Većina opće prihvaćenih teorija o NK-stanicama dovedena je u pitanje rezultatima istraživanja provedenih pomoću novih tehnologija i osmišljenih novim eksperimentalnim pristupima. Najvažnija nova saznanja o NK-stanicama u čovjeka dobivena su kada je postalo moguće kloniranje ovih stanica (151,178). Ovaj pristup koristi se za proučavanje funkcijskih sposobnosti i površinskih molekula sa receptorskom funkcijom.

### 2.3.1.3.1. NK stanice u trudnoći

Za obimniju nazočnost velikih granuliranih stanica u trudnoći zna se već nekoliko godina, a primarno su bile opisane u sekretornoj fazi endometrija i humanoj decidui prvog tromjesjeća trudnoće. Te stanice su različito nazivane; kao "granulirane endometrijske stromalne stanice", "K stanice" i "endometrijski stromalni granulociti". Potječu od endometrijskih stromalnih stanica i otpuštaju relaksin (32). Naziv koji je danas u upotrebi za ove stanice je decidualni granulirani limfociti (DGL). Fenotipski odgovaraju maloj subpopulaciji NK stanica periferne krvi koja je CD56<sup>bright</sup> pozitivna, a CD16 negativna (107). Imunohistokemijskim studijama dokazano je da se radi o stanicama fenotipa: CD3<sup>+</sup>, CD2<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, MHC razreda II- (25,62). Također snažno eksprimiraju CD38 (antigen koji eksprimiraju hematopoetske matične stanice, protimociti, timociti, aktivirani limfociti T i B, mijelociti, promijeloblasti, O-stanice). Negativni su na CD16 i CD57 (NK stanični antigeni) (27,195). NK obilježja ovim stanicama daje ekspresija CD56 antigena. CD56 pozitivni DGL tri do četiri puta su brojniji u decidui nego u proliferacijskom endometriju (67). Iako ih možemo naći razasute po čitavom endometriju, ipak pokazuju tendenciju nakupljanja oko uterinih žljezda i krvnih žila. Većina ovih stanica eksprimira CD2 i CD7 antigen (67). Dvostrukim obilježavanjem monoklonskim protutijelima pokazano je da CD56 pozitivni DGL ne eksprimiraju CD57 (drugi marker NK stanica), a tek mali postotak (oko 13%) koekspirimira CD16 antigen (107). CD56 pozitivni DGL različito su granulirani, a jedan dio tih stanica je negranuliran, što upućuje na nezrelost negranulirane populacije. Pojava granula i ekspresija CD2 antigena znaci su ontogenetskog razvitka ovih stanica (25).

O ontogenetskom razvitku DGL može se raspravljati na bazi saznanja koja se uglavnom baziraju na proučavanju sazrijevanja NK stanica uopće. Tako se zna da se NK stanice normalno razvijaju i bez nazočnosti normalnog timusa (77). Usprkos svojoj neovisnosti o timusu i odsustvu

TCR, NK-stanice dijele sa limfocitima T mnoge zajedničke osobine kako glede izražavanja istih površinskih antigena, tako i glede efektorskih funkcija kao što su citolitička aktivnost i proizvodnja limfokina (242). Ove činjenice podržavaju pretpostavku da T i NK-stanice pripadaju srodnoj staničnoj liniji. U literaturi se pojavljuju brojni podaci koji rasvjetljavaju odnose između ovih dviju vrsta stanica. Podaci su dobiveni analizom diferencijacije limfocita tijekom fetusne ontogeneze, kao i razvojem *in vitro* sistema koji uspješno oponašaju *in vivo* uvjete neophodne za sazrijevanje T i NK-stanica iz prekursora nazočnih u humanom postnatalnom timusu ili u fetalnoj jetri (80,120,133). Rodewald i suradnici opisali su populaciju ranih fetusnih timocita u miša koji imaju potencijal diferencijacije u T ili NK-stanice ovisno o uvjetima *in vitro* mikrookoliša (131). 14.5 dana gestacije predominantna populacija stanica u timusu ne izražava CD4 niti CD8, ali izražava FcγRII/III nekoliko dana prije no što počme izražavati TCR. Kada se ova populacija kultivira u timusnom mikrookolišu, njena se diferencijacija usmjeri prema zrelim limfocitima T. Ako se pak ova populacija ukloni iz timusa, razvit će se u funkcionalne NK-stanice, kako *in vitro*, tako i *in vivo*. Ovi rezultati nedvojbeno pokazuju da se marker tipičan za zrele NK-stanice eksprimira rano tijekom ontogeneze limfocita T. Još je značajniji zaključak da rana nezrela populacija timocita može sazrijevati prema limfocitima T ili NK-stanicama, što ovisi o mikrookolišu.

Granulirana-zrela populacija DGL u svojim granulama sadrži perforin što dodatno upućuje na moguću NK aktivnost ovih stanica. Na koje sve načine se mogu stimulirati DGL do danas još nije posve razjašnjeno. Porast broja ovih stanica u endometriju, kao posljedica djelovanja progesterona, mogla bi ukazivati na pglavitu ulogu hormonskih poticaja. S druge strane, nazočnost embrija, sa svim svojim antigenskim specifičnostima, mogla bi aktivirati DGL. Tome u prilog govori NK aktivnost ovih stanica, koja je dokazana samo za stanice decidue prvog tromjesječja trudnoće (67,78,23), dok DGL sekrecijskog endometrija nisu sposobni lizirati NK osjetljive linije (25). Bez obzira da li su za aktivaciju DGL potrebni

hormonski ili antigenski stimulusi, iz niz eksperimenata na CD3 negativnim CD56 pozitivnim klonovima decidualnih limfocita prvog tromjesečja trudnoće, poznato je da ove stanice sporo proliferiraju (32). Ipak, opažanje da se ove stanice mogu dijeliti, osobito u sekrecijskoj fazi menstrualnog ciklusa, te ekspresija Ki67 proliferacijskog markera (177), ukazuje samo na nedefiniranost čimbenika koji bi potakli DGL na proliferaciju. Otkrivanje tih čimbenika omogućilo bi duže održavanje DGL u kulturi i lakša in vitro istraživanja.

#### **2.3.1.3.2. Saznanja o NK stanicama u trudnoći dobivena istraživanjem na laboratorijskim glodavcima**

Gravidni uterus glodavaca sadrži znatnu populaciju velikih granuliranih, tzv. GMG stanica (engl. granulated metrial gland), za koje brojna istraživanja sugeriraju da su slične NK i LAK stanicama (267,266). Te stanice, porijeklom iz koštane srži, veličine 20-50um, diferenciraju se in situ iz malih-limfocitima sličnih prekursora. Ekspimiraju glavne leukocitne antigene i antigene asialo-GM1, Thy-1, perforin i serin esterazu (266), što im daje NK i LAK fenotipska obilježja. Akumuliraju se tijekom trudnoće u decidui i metrijalnoj žlijezdi, te su enzimskom digestijom izolirane iz decidue i metrijalne žlijezde. O funkcijoj aktivnosti ovih stanica saznanja su veoma oskudna, dok su nešto veća saznanja o njihovoj distribuciji. Tako se zna da se ove stanice najprije javljaju u uterinoj stijenci, prije implantacije blastociste, a kasnije ih nalazimo u decidui, cirkulatornoj muskulaturi i konačno u mezometrijalnom trijangu, prije formiranja metrijalne žlijezde (219). Posebno treba naglasiti njihovo prisustvo u labirintu posteljice, gdje dolaze u intiman kontakt sa trofoblastnim stanicama, uz elektronskom mikroskopijom pokazane morfološke promjene i GMG i trofoblastnih stanica. Ove stanice sadrže velike granule koje su



perforin pozitivne, pa su upravo GMG stanice dale značajan doprinos istraživanju tog citolitičkog proteina (267,266)

## **2.4. MEHANIZMI CITOTOKSIČNOSTI**

### **2.4.1. T stanična citotoksičnost**

Pod utjecajem antigena mirujući limfociti T fenotipa  $CD8^+$  prelaze u aktivne (citotoksične) limfocite T (CTL - eng. cytotoxic T lymphocytes), koji mogu u izravnom dodiru lizirati ciljne stanice. Pritom se umnaža antigen specifični klon  $CD8^+$  limfocita T. Pomagački limfociti T ( $CD4^+$ ) pospješuju stvaranje CTL, što se očituje u pojavi većeg broja citotoksičkih stanica. Ovaj efekt posredovan je interleukinom-2 (IL-2), kojeg izlučuju  $CD4^+$  limfociti T. Specifičnost reakcije osigurava se na taj način što IL-2 djeluje samo na aktivirani klon CTL, koji tek po aktivaciji eksprimira na svojoj membrani receptor za IL-2 (17). Oblaganje ciljnih stanica protutijelima protiv MHC antigena ukida citotoksičnost limfocita T.

### **2.4.2. NK stanična citotoksičnost**

NK stanice su subpopulacija velikih granuliranih limfocita koji se mogu razlikovati od limfocita T i B i mijelomonocitnih stanica na temelju njihova porijekla, fenotipa i funkcije. Definiiraju se kao  $CD3^-$ ,  $CD2^{+/-}$ ,  $CD8^{+/-}$ ,  $CD16^{+/-}$  i  $CD56^+$ . NK stanice mogu se naći u krvi i tkivima bilo kao  $CD16^+CD56^+$  ili  $CD16^-CD56^+$  (256). Snažnu citotoksičnost pokazuju prema brojnim ciljnim staničnim linijama i bez prethodne senzibilizacije. Ova citotoksična aktivnost nije uvjetovana prepoznavanjem MHC antigena. Podrijetlo ovih stanica još uvijek nije posve jasno. Smatra se da im je podrijetlo u koštanoj srži, te da njihovo sazrijevanje nije vezano uz timus. Neki autori misle da su NK stanice dio primitivnog imunog sistema, tj. pretpostavlja se da su prekursori citotoksičkih limfocita T.

## 2.5. PERFORIN

Perforin je citoplazmatski - granularni citolitički glikoprotein molekulske mase od oko 70 KD, komplementaran C9 komponenti komplekta (131). Perforin pozitivne stanice primarno su opisane uz virusna, autoimuna i tumorska oboljenja, gdje postoji imunološko prepoznavanje (197,158). Stanice koje sadrže perforin nisu videne u slezeni, plućima, jetri, žlijezdama slinovnicama i koži (197,158). Perforin je predmet intenzivnog istraživanja unazad 10 godina, kao jedan od primarnih čimbenika u posredovanju citotoksičnosti citotoksičnim T limfocitima (CTL) i prirodnim stanicama ubicama (NK).

### 2.5.1. Građa perforina

Perforin je pročišćen iz citoplazmatskih granula mišjih NK i CTL klonova, te je sa SDS-PAGE (eng. sodiumdodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis) dokazano da se radi o glikoproteinu molekulske mase od 65-70 KD. Klonirana je cDNA mišjeg, humanog i štakorskog perforina i na taj način određena njegova primarna struktura (132,142,220). Perforin sve tri species građen je od 534 aminokiseline, s gotovo identičnom molekulskom masom od otprilike 60 KD. Mišji i štakorski perforin, zbog sadržaja jednog glikozilacijskog mjesta više od humanog, rezultira nešto višom molekulskom masom na SDS-PAGE. Homologija mišjeg i humanog perforina iznosi 68%, a slična homologija pronađena je za humani i štakorski perforin (69%), te mišji i štakorski perforin 85% (132,142,220). Humani perforin primarno je nazivan "C9-srodan protein", na bazi funkcionalne i strukturalne sličnosti između perforina i te komponente komplekta (171,243,252). Određivanje primarne strukture perforina i C9 komponente komplekta pokazalo je da između njih postoji visoka regionalna homologija. Ona se prvenstveno odnosi na slijed prvih 34 amino-kiselina N-terminalne regije, koje mogu spontano inzerirati u staničnu

membranu, što ističe važnost ove regije u formiranju pora i lizi stanice (29). Centralni dio perforina, koji sadržava otprilike 300 amino-kiselina, pokazuje oko 20% homologije sa komponentama komplekta: C6, C7, C8 alfa, C8 beta, i C9, što je znatno niža homologija od one sa N-terminalnom regijom (29). Na bazi tih strukturalnih sličnosti, formiranje pora perforinom na ciljnoj stanici je proces vjerojatno sličan formiranju pora komplementom.

### **2.5.2. Zastupljenost perforina u stanicama i staničnim linijama**

Niz istraživača, služeći se vrhunskom tehnologijom (Northern-blotting tehnikom, in situ hibridizacijom i imunohistologijom), uz upotrebu mAt protiv mišjeg rekombinantnog i humanog perforina, definitivno su pokazali da se perforin eksprimira in vivo i in vitro, u fiziološkim i patofiziološkim uvjetima. Brojni su dokazi za to, kako na mišjim eksperimentalnim modelima, tako i na humanom materijalu i staničnim linijama. Imunohistološkim obilježavanjem s mAt protiv mišjeg rekombinantnog perforina pronađena je ekspresija perforina u 12-15 % asijalo-GM1 pozitivnih NK stanica i 7-21 % CD8<sup>+</sup> T stanica (104). Intenzitet ekspresije perforina najviši je u NK 1.1<sup>+</sup> subpopulaciji. Značajna ekspresija perforina detektirana je u oko 48% CD8<sup>+</sup> stanica peritonealnog eksudata, nakon intraperitonealne imunizacije s alogeničnim splenocitima (105), što može upućivati na njihovu veću citolitičku aktivnost (105). Ekspresija perforina zabilježena je i u granuliranim stanicama metrijalne žlijezde, kožnim gama/delta stanicama (110), te u alfa/beta i gama/delta T stanicama crijevnog epitela (76). U patološkim uvjetima, perforinska ekspresija dokazana je u limfocitima tijekom mišjeg virusnog horiomeningitisa, virusnog miokarditisa (216), u reakciji domaćina protiv transplantata (70), u autoimunom diabetesu (244) i lupus eritematodesu (159). U svim prije navedenim slučajevima, ekspresija perforina pokazala je dobru korelaciju sa citolitičkom aktivnošću i oštećenjem tkiva. Veoma zahvalnim za istraživanje

perforina pokazali su se limfociti periferne krvi (LPK). Oni konstitutivno eksprimiraju značajan nivo mRNA za perforin u NK i gama/delta T stanicama (160). Perforin-protein je visoko eksprimiran i u CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> limfocitima periferne krvi, kao i u gama/delta T stanicama (160). Perforin se eksprimira u 20-30% CD8<sup>+</sup> T stanica, i to CD11b<sup>+</sup> subpopulacija CD8<sup>+</sup> T stanica eksprimira perforin, što sugerira da ta subpopulacija CD8<sup>+</sup> T stanica in vivo predstavlja efektorske citotoksične T limfocite. U 40-60% CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> T stanica perforin nije prisutan konstitutivno, ali se ekspresija može inducirati sa anti-CD3 mAt i IL-2, što sugerira da ova subpopulacija CD8<sup>+</sup> T stanica predstavlja prekursore CTL (259) Interesantno je da i u 5-20% CD4<sup>+</sup> T stanica, koje konstitutivno ne eksprimiraju perforin, različitom stimulacijom također možemo inducirati sintezu perforina (259). U svim ispitivanjima ekspresija perforina je u dobroj korelaciji sa citolitičkim potencijalom, kako u nestimuliranih, tako i u stimuliranih limfocita periferne krvi. U patološkim uvjetima, kao što su: akutna transplantacijska reakcija na srčane i bubrežne alotransplantate (103), reumatoidni artritis (70), miokarditis (79), i u pacijenata sa infektivnom mononukleozom, inficiranih sa Epstein-Barr virusom (259), dokazana je prisutnost perforin pozitivnih stanica u patološki promijenjenom tkivu. Veliki doprinos poznavanju zastupljenosti perforina dala su istraživanja na perforin pozitivnim staničnim linijama. Perforin se eksprimira u svim mišjim CD8<sup>+</sup> CTL klonovima, što je testirano Northern blot analizom ili imunohistokemijskim obilježavanjem. Istim tehnikama dokazano je da većina CD4<sup>+</sup> TH-2 klonova i neki TH-1 klonovi eksprimiraju perforin, te liziraju eritrocite obložene sa anti-CD3 mAt, kao i nukleirane ciljne stanice (120).

### **2.5.3. Regulacija ekspresije perforina**

Geni za perforin u miša i čovjeka klonirani su i mapirani na kromosomu 10. Sadrže tri eksona koji zauzimaju oko 7kb (133,241). 5' postranična regija gena za perforin sadrži mogući promotor i ostale

regulacijske sekvence. Između 5' postraničnih regija gena za perforin u čovjeka i miša postoji velika srodnost, pa se vjeruje da slični mehanizmi nadziru prepisivanje gena za perforin u čovjeka i glodavaca. Istraživanja regulacijskih elemenata, nazvanih NF-P motiv, pružila su neke odgovore u svezi sa regulacijom izražavanja gena za perforin u ubilačkim stanicama (111). Dvije bjelančevine (ili bjelančevinska kompleksa), nazvane NF-P1 i NF-P2, stupaju u vezu sa oligonukleotidima NF-P motiva. NF-P1 pronađen je u svim ispitivanim staničnim linijama, ali je NF-P2 bio nazočan samo u aktiviranim citotoksičnim limfocitima. Nadalje, uključivanjem NF-P motiva u reporterski plazmid pojačalo se izražavanje reporterskoga gena nakon transfekcije u citotoksične limfocite, ali ne i u ne-citotoksične limfocite. Ovi rezultati ukazuju da su NF-P motiv i pripadajuća bjelančevina NF-P2 čimbenici važni za regulaciju gena za perforin u citotoksičnim limfocitima miša. No s obzirom na nazočnost drugih regulacijskih elemenata pronađenih tijekom analize 5' postranične regije sve do ostatka -5000, vjerojatno je u regulaciju prepisivanja gena za perforin uključeno više *cis*- i *trans*-akcijskih čimbenika, pa je stroga ograničenost izražavanja perforina u ubilačkim stanicama rezultat njihove međusobne suradnje (137).

Mehanizam odgovoran za poticanje ekspresije perforina u NK i gama/delta stanicama (konstitutivno) i CD8<sup>+</sup> T stanicama (inducirano), te mehanizam odgovoran za ograničavanje ekspresije perforina u NK i T stanicama, nije do danas sasvim jasan. Brojna istraživanja upućuju da je IL-2 primarni citokin odgovoran za regulaciju ekspresije perforina. U humanim NK i gama/delta T stanicama, koje konstitutivno ekspimiraju i mRNA za perforin i perforin protein, IL-2 nema značajnijeg uticaja na povećanje ekspresije perforina (160,225). Suprotno, u CD8<sup>+</sup> alfa/beta pozitivnim T stanicama, sam IL-2 snažno inducira prolazan porast mRNA za perforin (160,225). Sam IL-6 nije u stanju inducirati ekspresiju perforina u CD8<sup>+</sup> T stanicama, ali je učinkovit zajedno sa IL-2 (138). TGF-beta djeluje inhibicijski na induciranu mRNA za perforin, i to nakon indukcije s IL-2 ili kombinirane indukcije s IL-6 i IL-2. Citolitički potencijal IL-2

induciranih CD8<sup>+</sup> T stanica bio je uvijek u dobroj korelaciji sa ekspresijom perforina. Od ostalih stimulusa, OKT3 mAt brzo inducira ekspresiju perforina u T stanicama periferne krvi, uz prisustvo monocita (225). To ukazuje na CD3 molekulu kao signalnu molekulu, neovisnu o IL-2, pošto monoklonska protutijela protiv IL-2 ili IL-2 receptora nisu inhibirala indukciju perforina sa OKT3 mAt. Tetraforbol acetat (TPA) i forbol miristat acetat (PMA) u kombinaciji sa Ca<sup>2+</sup>-jonoforom, ili Ca<sup>2+</sup>-jonofor sam nije u stanju inducirati mRNA za perforin u T stanicama periferne krvi (225). Forbolski esteri u kombinaciji sa lektinima sposobni su inducirati mRNA za perforin (135).

#### 2.5.4. Uloga perforina u citolizi

Kroz mnoge studije uočeno je da postoji perforin-ovisan i perforin-neovisan mehanizam lize ciljnih stanica. Istraživanja su vršena na T staničnim klonovima, i to: CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>P<sup>-</sup> T staničnim klonovima. Dokazano je da većina CD4<sup>+</sup> TH-2 staničnih klonova i neki TH-1 klonovi ekspimiraju perforin, te efikasno liziraju eritrocite obložene sa anti-CD3 mAt, kao i ciljne stanice koje sadrže jezgru (120). Suprotno tome, neki TH-1 i TH-2 CD4<sup>+</sup> stanični klonovi, koji su perforin negativni, također su efikasno, poput CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup> CTL, lizirali ciljne stanice sa jezgrom, ali nisu bili efikasni u lizi eritrocita (120). To jasno govori o postojanju perforin neovisnog citolitičkog mehanizma, koji je učinkovit u lizi ciljnih stanica, gotovo jednako kao i mehanizam ovisan o perforinu. Potvrdu o postojanju perforin-ovisnog mehanizma lize ciljnih stanica dala su slijedeća saznanja: a) perforin je pročišćen iz citoplazmatskih granula mišjih NK i CTL staničnih klonova (188) b) citoplazmatske granule izolirane iz NK i CTL staničnih linija direktno su citotoksične za različite ciljne stanice i formiraju pore na membrani ciljnih stanica (265) c) dokazane su prstenaste tubularne lezije na membrani ciljnih stanica, koje izgledaju isto kao lezije izazvane komplementom, nakon lize sa perforin pozitivnim NK i CTL

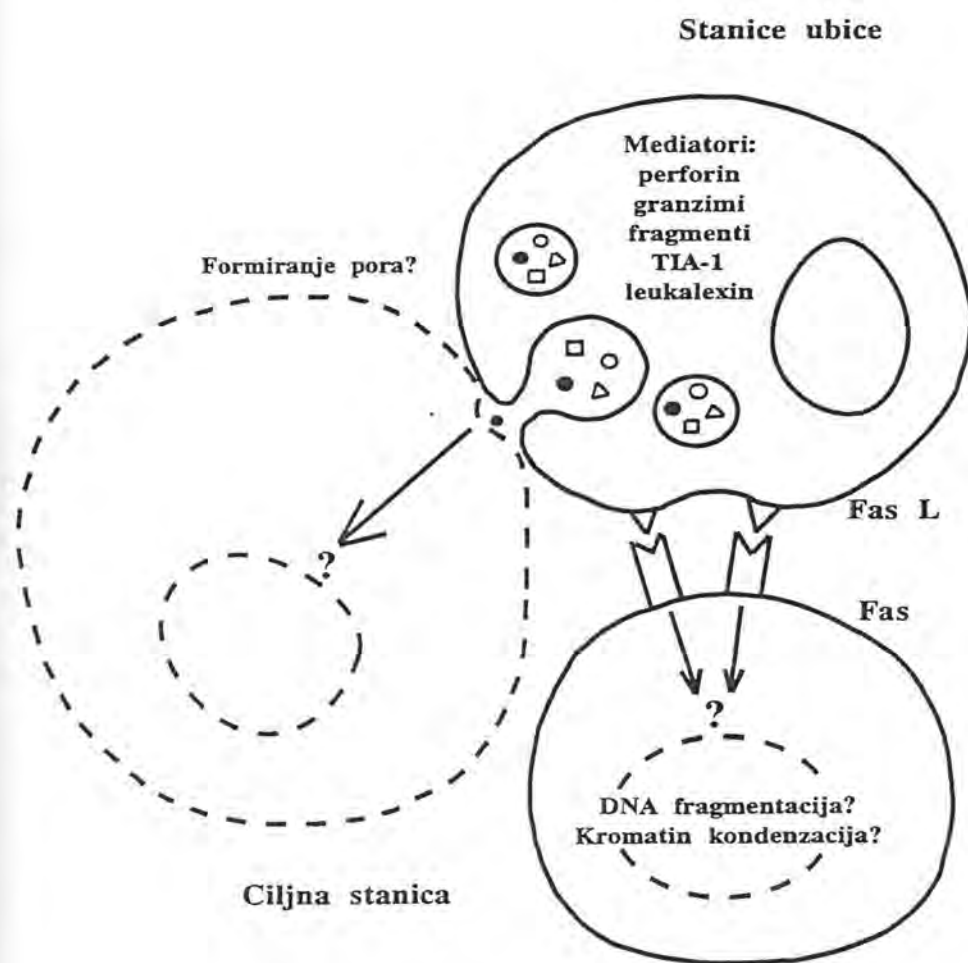
staničnim klonovima (44,187) d) elektronskom mikroskopijom dokazana je orijentiranost granula prema veznom mjestu za ciljnu stanicu, u perforin pozitivnim CTL i NK stanicama, te egzocitoza sadržaja granula uključujući i perforin, kroz membransku pukotinu formiranu između ciljne stanice i stanice ubice (260) e) neki  $CD4^+$  T stanični klonovi, u kojima je dokazan sadržaj perforina u granulama, efikasno liziraju nukleirane ciljne stanice (120) Zaključno, o perforinskom mehanizmu citolize mogli bismo reći da započinje vezanjem perforin pozitivne stanice za membranu ciljne stanice. Nakon toga dolazi do direktnog vezanja perforinskih molekula za membranu ciljne stanice, uz prisustvo  $Ca^{2+}$ , a neovisno o temperaturi. Naime, taj proces inzercije perforina za membranu ciljne stanice odvija se jednako na  $+4^{\circ}C$ , kao i na  $+37^{\circ}C$  (260). Suprotno tome, konformacijske promjene molekula perforina, slične viđenim u C9 komponenti komplementa, te polimerizacija više molekula perforina, odvija se samo na  $+37^{\circ}C$ . Monomeri perforina vežu se i umeću u membranu ciljne stanice i polimeriziraju u nakupine koje sadrže različit broj monomera. Čini se da je za početno vezivanje perforina potrebna nazočnost fosforilkolinskih lipidnih ostataka na membrani ciljne stanice. Monomeri perforina nakupljaju se oko središnjeg otvora (pore), čiji promjer raste uključivanjem sve većeg broja monomera. Vjerojatno su hidrofobni aminokiselinski ostaci perforinskih monomera usmjereni prema acilnim lancima membranskih lipida, dok hidrofilni ostaci oblažu unutrašnjost otvora. S obzirom na broj monomera uključenih u tvorbu tubulnih kompleksa na membrani ciljne stanice, njihov promjer iznosi od 5 do 20nm (200). U pokusima koji su ispitivali učinke različitih doza perforina dokazalo se da je za tvorbu funkcijski učinkovite pore potrebno tri do četiri monomera, a da istom nakon nakupljanja 10 do 20 monomera nastaje tubulni kanal vidljiv elektronskim mikroskopom. Formirani transmembranski kanal omogućuje ulaz citoplazmatskih molekula u ciljnu stanicu, te ulaz vode i iona, kao i sadržaja citoplazmatskih granula stanice ubice. Rezultat tih događanja je osmotska liza, dezintegracija jezgre i DNA fragmentacija ciljne stanice.

Čini se da veliki kanali nastaju samo u nazočnosti visokih doza perforina, te da je fiziološka važnost mnogobrojnih malih kanala čak i veća za poremetnju propusnosti membrane ciljne stanice i njezinu osmotsku lizu (137). Perforin sam po sebi ne izaziva morfološke i biokemijske promjene koje se vezuju uz ubijanje posredovano limfocitima (tj. apoptotske promjene). To je potaklo istraživanje drugih posrednika koji bi mogli izazvati smrt ciljne stanice. Od molekula sadržanih u staničnim zrnima najbolje su istražene proteinaze nazvane granzimima (204). Broj pripadnika ove obitelji svakodnevno se povećava. Najbolje su opisani granzim A (nedavno je pokazano da se radi o molekuli identičnoj fragmentinu 1) (219) i granzim B (fragmentin 2) (206) koji jesu uključeni u lom DNK ciljne stanice. Pročišćeni granzimi A ili B mogu izazvati brzi lom DNA stanice čija je membrana permeabilizirana sub-litičkim dozama perforina (218,219). Necitolitičke RBL (rat basophilic leukemic) stanice transfecirane sa cDNK za perforin i granzim A (ili granzim B) mogle su izazvati lizu ciljnih stanica s jezgrom i potaknuti lom DNK, dok iste stanice transfecirane sa cDNK za samo jedan od ovih posrednika nisu mogle izazvati mjerljivu citolizu (221). Još jedna bjelančevina izolirana iz zrnaca NK-stanica štakora, TIA-1, može izazvati lom DNK stanica permeabiliziranih digitoninom, ali ne i u stanica neoštećene membrane (240). Ovi rezultati pokazuju da ovakovi posrednici, bez obzira na mehanizam djelovanja pri lomu DNK napadnute stanice, trebaju ući u samu stanicu kako bi započeli apoptotski program. Perforin pomaže ovaj ulazak na dva moguća načina: (1) perforinske pore na membrani ciljne stanice poremete unutarstaničnu homeostazu i potaknu endocitne procese popravka stanične membrane slične onima koje uslijede nakon napada stanice komplementom (154); tijekom popravka, granzimi, TIA-1 i/ili slične molekule koje ubilački limfociti otpuštaju istovremeno s perforinom ulaze u stanicu endocitozom; (2) pore izazvane perforinom (čiji unutrašnji promjer može dosizati čak 20nm) mogu služiti kao neposredan fizički vodič kojime će posrednici citotoksičkih limfocita utjecati u ciljnu stanicu. Prva je



pretpostavka potkrijepljena pokusima sa tvarima koje mogu potaknuti ili zakočiti endocitozu (212). Nekim citotoksinima sporoga djelovanja kao što su  $TNF\alpha$ ,  $TNF\beta$  i  $TNF$ -srodna bjelancevina nazvana leukalaksin (136), oštećenja ciljne stanice uzrokovana perforinom vjerojatno olakšavaju i ubrzavaju aktivnost. Tako bi perforin mogao biti uključen u citolizu posredovanu citotoksičnim limfocitima na neizravan, ali ipak presudan način (slika 1).

**Slika 1. "Višestruki mehanizmi" prikaz limfocitima-posredovanog ubijanja (Liu C-CL. i ost.: Immunology Today, 16:194, 1995).**



### 2.5.5. Miševi sa mutacijom gena za perforin

Bez obzira na to je li uloga perforina u citolizi izravna (litička) ili posredna (sprovodnička), najvažnije je pitanje je li perforin neophodan za ubilačke funkcije limfocita. Nedvosmislen odgovor na ovo pitanje bilo je moguće dobiti primjenom tehnika rekombinacije gena. U nekoliko laboratorija, neovisno jedni od drugih, stvoreni su miševi s mutacijom gena za perforin ( $P^{-/-}$  miševi) (97,100,255). Citolitička aktivnost limfocita ovih miševa ispitivana je *in vivo* i *in vitro*. Fiziološki i mikroskopski  $P^{-/-}$  miševi su zdrave životinje, sa normalno razvijenim limfatičnim tkivima i organima. Usprkos nazočnosti velike količine perforina u granuliranim stanicama metrijskih žlijezdi  $P^{+/+}$  miševa,  $P^{-/-}$  miševi ne pokazuju nenormalnosti tijekom trudnoće i okota (100). LAK stanice dobivene iz splenocita ovih miševa sadrže citoplazmatska zrnca slična onima iz  $P^{+/-}$  i  $P^{+/+}$  miševa, što ukazuje na neoštećen proces granulogeneze. Ipak,  $P^{-/-}$  miševi nisu bili sposobni ukloniti virus limfocitnog koriomeningitisa (LCMV), mada su razvili značajan imuni odgovor koji je svakako uključio i  $CD8^{+}$  stanice (97,100,255).  $P^{-/-}$  limfociti potaknuti *in vitro* bilo na antigen-specifičan (LCMV ili aloantigeni) ili na antigen-nespecifičan način (forbol 12-miristat 13-acetatom istovremeno sa ionomicinom ili IL-2) nisu bili učinkoviti u lizi fibroblastnih ciljeva (255). Slične su promjene uočene i u aktivnosti NK-stanica  $P^{-/-}$  miševa (97,100). Uočeni gubitak citolitičke aktivnosti može se pripisati bilo neposredno potpunom manjku perforina kao snažnog posrednika u lizi, ili opet posredno, gubitku ulaznog puta za druge posrednike kao što su granzimi. Osim nesposobnosti uklanjanja LCMV-a,  $P^{-/-}$  miševi imali su smanjenu sposobnost u nadzoru rasta uštrcanih stanica fibrosarkoma (100), što bi značilo da je nadzor nad akutnom LCMV infekcijom kao i uklanjanje autolognih i nekih tumorskih stanica potpuno ovisno o nazočnosti funkcijski aktivnog perforina. S druge strane, aktivirani  $P^{-/-}$  limfociti mogli su lizirati neke ciljne stanice hematopoetskog porijekla, ukoliko su one izražavale Fas antigen (101,112,255). Ubijanje se odvijalo

lomom DNK ciljnih stanica (112,141). Ovisnost ovoga ubijanja o Fas antigenu potvrđena je u pokusima inhibicije mPt protiv Fas antigena ili Fas-Fc kimeričnim molekulama (101). Još nije poznato zašto  $P^{-/-}$  miševi ne mogu ukloniti LCMV, usprkos neoštećenoj Fas-ovisnoj lizi uočenoj *in vitro*. Vjerojatno je virus pohranjen u Fas<sup>-</sup> tkivima koja služe kao pričuva za virus. Mada se čini da se Fas-ovisni i perforin-ovisni litički mehanizmi nadopunjavaju, ta je nadopuna, sudeći prema nemogućnosti  $P^{-/-}$  miševa da uklone LCMV i neke tumorske stanice, u najmanju ruku nepotpuna. Uzeti kao cjelina, rezultati dobiveni na  $P^{-/-}$  miševima ukazuju na presudnu ulogu perforina u modelu citolize egzocitozom zrnaca, ali i na postojanje drugačijih načina citolize posredovane ubilačkim stanicama.

## 2.6. STANIČNA SMRT

Stanična smrt u multicelularnom organizmu može biti slučajna ili programirana. Morfološke promjene programirane smrti stanica obično je apoptoza a ne nekroza stanica. J. John Cohen (37) je opisao promjene u apoptozi diskutirajući usputno o mogućim regulacijskim mehanizmima i genima, te naglašavajući značajnu razliku između apoptoze i nekroze. U nekrozi značajne promjene su u mitohondrijima. Mijenja se njihov oblik i funkcija, te stanica veoma brzo gubi homeostazu. Uzrok smrti stanice primarno je u promjeni membrane, naime ona gubi mogućnost reguliranja osmotskog tlaka, te stanica bubri i puca. Sadržaj se izljeva u međustanični prostor i izaziva upalni odgovor (37).

### 2.6.1. Apoptoza

Apoptoza je stanična smrt u kojoj je proces umiranja jedva zamjetljiv. Razlog staničnog umiranja, kao i put aktivacije različit je za različite stanične tipove, ali je mehanizam umiranja zajednički svim staničnim tipovima. Tako se apoptoza limfocita opisuje u nekoliko stadija: a)

normalna stanica s citoplazmom i heterogenetičkim kromatinom jezgre b) gubitak staničnog volumena s gusto nakupljenim citoplazmatskim organelama i klampiranim kromatinom jezgre c) stanica pokazuje izdanke (zeosis) d) nastavak smanjivanja staničnog volumena, a kromatin potpuno propada e) jezgra propada u crnu rupu f) tako kolabirana jezgra se cijepa na kuglice i konačno g) fragmentacija stanice na apoptotičke dijeliće (37).

#### **2.6.1.1. Molekule koje sudjeluju u apoptozi**

Apoptoza je genetički regulirana. Pojedinačni geni mogu biti uključeni u apoptozu na dva načina: jedni se eksprimiraju u stanicama koje ulaze u apoptozu, drugi moduliraju taj proces. Tako c-myc proto-onkogen igra ulogu u regulaciji odabira između proliferacije i apoptoze (54) Adenovirus gen E1A mogući je analog c-myc (190) Anti-onkogen p53 također je uključen u apoptozu. Produkt je zastoja stanične proliferacije (65) i može rezultirati prekapćanjem u proliferaciju ravnu smrti. Onkogen bcl-2, mogući je anti-apoptotički gen, ali ne može zaštititi ciljnu stanicu od citotoksičnih učinaka citotoksičnih T stanica. (247) TRPM-2 gen, kojeg još nazivaju SGP-2, eksprimira se u mnogim tkivima, primarno u urogenitalnom traktu tijekom apoptoze. RP-2 i RP-8 su dva gena čija ekspresija raste nakon indukcije apoptoze u timocita (175)

Posebnu pažnju zaokuplja Fas gen, čiji je produkt Fas antigen, membranski protein homologan faktoru nekroze tumora i receptoru neuralnog čimbenika rasta. Fas je analog humane površinske molekule otkrivene kao APO-1 (168). Otkrivena je različita ekspresija Fas antigena u različitim staničnim podvrstama i u različitim tkivima. Tako je viđen u timusu, slezeni, ovariju, srcu te u mijeloidnim stanicama i fibroblastima (250,147), te u aktiviranim T i B limfocitima (147,231). Apoptoza se može inducirati interakcijom površinske molekule Fas ili APO-1 sa specifičnim antitijelom za te molekule (168). Fas molekulu veže Fas ligand, molekula koja je eksprimirana na različitim CTL staničnim linijama (186), aktivirani

splenociti (186) i tkivo testisa (174). Fas ligand vežući se za Fas molekulu na ciljnim stanicama posreduje u apoptozi tih stanica (95), a jedna je od mogućih efektorskih molekula u CTL- posredovanoj citotoksičnosti, čiji mehanizam još nije jasan. Fas i Fas-ligand eksprimiraju se zajedno na aktiviranim T limfocitima, što sugerira da oni sudjeluju u kontroli staničnog rasta i to primarno putem stanične smrti koja je posrdovana međusobnom interakcijom Fas-liganda i Fas receptora (248).

TJ-6 je također jedna od efektorskih proteinskih molekula programirane smrti stanica. Smatra se da je TJ-6 protein s imunosupresivnim djelovanjem, pa se primarno nazivao T supresorski faktor, koji možda igra važnu ulogu u preživljavanju fetalnog semialotransplantata tijekom trudnoće. Početne studije pokazale su da je moguće inducirati potpunu ablaciju trudnoće u mišica koje su bile tretirane s anti-TJ6 monoklonskim protutijelom (163).

Iz navedenih rezultata u literature, kao i iz dosadašnjim rezultata dobivenih u našem laboratoriju, čini se opravdano govoriti o postojanju velikog citolitičkog i apoptotičkog potencijala u neposrednoj blizini sa semialogenskim tkivom fetusa tijekom trudnoće, što nameće potrebu višestrukih mehanizama regulacije ekspresije citolitičkih i apoptotičkih molekula kako bi se trudnoća uspješno održala.

#### 2.6.1.2. TJ6

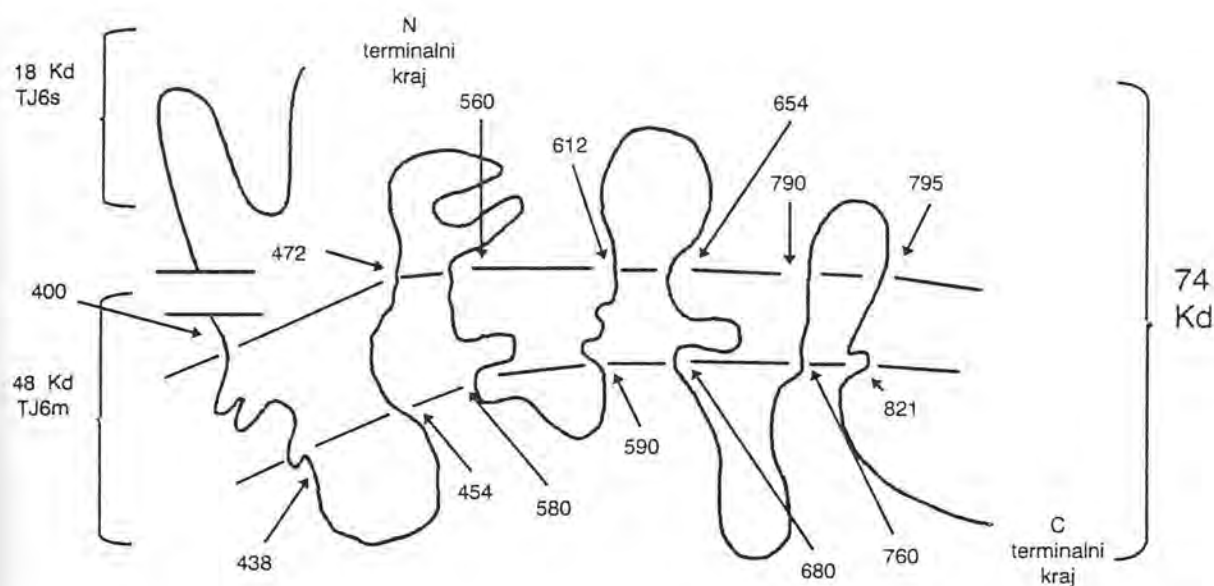
TJ6 je protein prvi put opisan 1990. godine (129), kojem se pripisuje imunosupresivna aktivnost u mnogim *in vitro* modelima (alogenički MLR; stimulacija limfocita periferne krvi sa PHA i anti-CD3 mAt). Neke studije sugeriraju imunoregulacijsku ulogu TJ6 proteina u timusnoj selekciji, kao i efektorsku ulogu u programiranoj smrti stanica (apoptozi). Pripisuje mu se i funkcionalna uloga u preživljavanju fetalnog alografta tijekom trudnoće.

### 2.6.1.2.1. TJ6 protein

TJ6 gen kodira protein od otprilike 98 KD. Strukturna analiza molekule sugerira postojanje dviju regija: jedna regija je hidrofobni karboksi terminalni kraj koji ima sedam transmembranskih vežućih regija; i druga je vanjski N-terminalni kraj.

Zreli TJ6 protein ekspirira se kao 70 KD velik protein koji se uglavnom post-translacijski modificira u dva manja proteina. Veći, protein veličine 42KD sadržava transmembranski dio molekule i označen je TJ6m (od eng. TJ6 membrane) (164), a manji sadržava N-terminalni kraj i topljiv je, te je nazvan TJ6s (od eng. TJ6 soluble). Pročišćena molekula TJ6s sa SDS-PAGE elektroforezom pokazuje veličinu od 18 KD u reduciranom i nereduciranom stanju (143). Ta dva proteina otkrivena su upotrebom dviju amino-kiselinskih sekvenci, koje pokazuju 98-100 postotnu identičnost između mišica i žena. TJ6m je identificiran sa amino-kiselinskom sekvecom 488-510, a TJ6s sa amino-kiselinskom sekvencom 245-270 kompletne molekule TJ6 proteina. Te dvije amino-kiselinske sekvence su uzete za proizvodnju dva sintetička peptida (poliklonska protutijela), koja se upotrebljavaju za detekciju TJ6 proteina na staničnoj površini u različitim tkivima, upotrebom Western blot analize, ELISA testa i protočne citometrije. Na molekuli TJ6 proteina uočeno je protein kinaza C (PKC) mjesto, mjesto serin proteaze, kao i nekoliko disulfidnih mostova (S-S). Interesantno je da amino kiselinska sekvenca TJ6 proteina pokazuje značajan postotak homologije sa H<sup>+</sup>-ATPaznom podjedinicom. Sekundarna struktura TJ6 proteina također je slična sekundarnoj strukturi ATPaze. Naime, i jedna i druga imaju hidrofilni amino-kraj i hidrofobni karboksi-kraj koji sadrži nekoliko transmembranskih regija (Slika 2).

Slika 3. Izoforme TJ6 proteina



#### 2.6.1.2.2. Ekspresija TJ6 proteina u trudnoći miša

TJ6 se normalno eksprimira u mišjem uterusu, ali ekspresija je povećana u decidualnim limfnim čvorovima koji dreniraju uterus tijekom trudnoće. TJ6 je lokaliziran u GMG stanicama u blizini mišje placente. Prisutan je i u postovulatornom endometriju uterusa, ali u povećanom broju u uterusu za vrijeme implantacije. Neki eksperimenti sugeriraju da ekspresija TJ6 molekule u uterusu i slezeni ovisi o procesu implantacije, dok njegova ekspresija u regionalnim limfnim čvorovima uterusa ne ovisi o periodu implantacije (87).

Northern blot analiza dokazala je prisusvo TJ6 mRNA u timusu, slezeni i fetoplacentnoj jedinici. Western blot analiza sugerira ekspresiju TJ6 proteina u različitim tkivima i staničnim linijama (stanična linija humane akutna limfocitne leukemije B, timus, fetoplacentna jedinica, fetus, slezena)

u različitim molekularnim veličinama, što govori o različitim izoformama istog proteina, koji su svi dokazani istom sekvencom anti-TJ6 poliklonskog protutitijela (143).

#### **2.6.1.2.3. Ekspresija TJ6 proteina na limfocitnim subpopulacijama gravidnih žena**

Tijekom trudnoće, specifične populacije limfocita ekspimiraju mjerljiv nivo TJ6m proteina na svojoj površini. TJ6m dokazan je na membrani gotovo svih CD19<sup>+</sup> B stanica tijekom normalne trudnoće, na koje otpada oko 8% sveukupnog broja limfocita (164). Dokazana je njegova prisutnost i na membrani CD3<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup> LPK tijekom normalne trudnoće, ali u manjem postotku. Kod gravida prije spontanog abortusa TJm prisutan je također na većini CD19<sup>+</sup> PBL, ali prisutnost nije dokazana na CD3<sup>+</sup> PBL. Na TJ6m<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> u žena sa spontanim abortusima otpada oko 20% sveukupnog broja PBL, što je znatno više nego u normalne trudnoće (164). Usporedba ovih podataka sa negravidama (HCG-), uočeno je da se TJ6m amo iznimno može naći na površini CD19<sup>+</sup> PBL, dok njegovo prisustvo na CD3<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup> PBL nije dokazano (164).

#### **2.6.1.2.4. Uloga TJ6 u trudnoći**

TJ6 proteinu se pripisuje imunosupresivna aktivnost u mnogim *in vitro* reakcijama, te kao takav može igrati funkcionalnu ulogu u preživljavanju fetalnog alografta tijekom trudnoće. Predhodne studije su pokazale da tretiranje mišica sa anti-TJ6 protutijelom u periodu implantacije dovodi do potpune ablacije trudnoće, dok davanje anti-TJ6 protutijela u drugim fazama trudnoće daje samo neznatne efekte (194). cDNA mišjeg TJ6 proteina klonirana je iz T staničnog hibridoma (A1.1) i pomogla je u otkrivanju bioloških funkcija TJ6. Tako TJ6 proizveden *in vitro* translacijom inhibira alogeničko prepoznavanje u MLR-i, gdje je



proliferacija uvjetovana potporom TH1 citokina, kao što je IL-2. To govori o mogućoj ulozi TJ6 u depresiji stanicama posredovanog imunološkog odgovora tijekom trudnoće (129). Pročišćeni TJ6s protein suprimira proliferaciju mononuklearnih limfocita periferne krvi za 80% u anti-CD3 proliferacijskom eseju, za 84% u ConA proliferacijskom eseju, te svega 14% u PHA proliferaciji. Ovaj različiti anti-proliferacijski učinak TJ6s možda je uvjetovan različitim prijenosom signala u stanicu. Naime, nekoliko studija je pokazalo da se PHA stimulacija odvija vezanjem CD2 molekule, dok anti-CD3 i ConA efekti preko CD3 kompleksa.

#### **2.6.1.2.5. TJ6 i programirana smrt stanica**

Dokazana imunoregulacijska uloga TJ6 i njegova lokalizacija u timusu dovele su TJ6 u moguću funkcionalnu vezu sa timusnom selekcijom i apoptozom. Beaman K. i suradnici pokazali su da deksametazonom inducirana apoptoza timocita dovodi do pojačane ekspresije TJ6 na površini stanica. Ekspresija je uočena na dvostruko pozitivnim timocitima CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Semi- kvantitativni RT-PCR upotrebljen za dokazivanje TJ6 mRNA prije i poslije tretmana timocita sa deksametazonom pokazao je da nema značajnih razlika u količini TJ6 mRNA između timocita u kojih je inducirana apoptoza i kontrolnih timocita. To ukazuje da je pojačana ekspresija TJ6 proteina na površini timocita nakon deksametazonske indukcije apoptoze uvjetovana posttranslacijski i može rezultirati povećanom translacijom TJ6 mRNA ili povećanim oslobađanjem TJ6 proteina iz intracelularnih skladišta. Upotrebom TJ6 antiproba uspješno se blokira deksametazonom inducirana apoptoza, što govori o specifičnosti ove reakcije (165). Slični rezultati su dobiveni i u modelu apoptoze izazvane sa stimulacijom anti-CD3ε A1.1 stanica. Naime i ti rezultati pokazuju, slično kao i u timocita, da je porast ekspresije TJ6 proteina u anti-CD3ε tretiranih A1.1 stanica posttranslacijski uvjetovan. I ova pojava je pokazala

specifičnost, jer TJ6 antiprobe su blokirale anti-CD3ε induciranu apoptozu (165).

### **2.6.1.3. Fas antigen-struktura i ekspresija**

Mišji Fas antigen sadrži 306 aminokiselina sa izračunatom masom od 34.971 i sadrži jednu transmembransku domenu koja dijeli molekulu u vanstaničnu i citoplazmatsku domenu. Nukleotidna sekvenca mišjeg Fas antigena je 59.5%, a slijed aminokiselina 49.3% identičana humanoj cDNA za Fas antigen.

2,1-Kb mRNA koja kodira Fas antigen detektirana je u mišjem timusu, srcu, jetri i ovarijima, ali ne u mozgu i slezeni. Ekspresija gena za Fas antigen u mišjim staničnim linijama (fibroblastima L929 i makrofagima BAM3 ) značajno je inducirana tretmanom sa IFN- $\gamma$ , ali ne sa INF- $\alpha$  i INF- $\beta$ . Gen koji kodira mišji Fas antigen smješten je u distalnoj regiji 19 kromosoma (250).

Struktura Fas antigena pokazuje strukturalnu homologiju sa brojnim receptorima na staničnoj površini uključujući TNF receptor i NGF receptor (251).

Miševi skloni limfoproliferativnoj mutaciji (lpr) imaju defekt u genu za Fas antigen. Miševi sa limfadenopatiom i autoimunom bolesti sličnoj SLE (sistemski lupus eritematosus) ukazuju na značajnu ulogu Fas antigena u negativnoj selekciji autoreaktivnih T stanica u timusu (251).

#### **2.6.1.3.1. Fas-ligand**

Upotrebom topljive forme mišjeg Fas antigena, pripremljenog pomoću fuzije s humanim Fc imunoglobulinom, detektiran je Fas-ligand na staničnoj površini citotoksičnih T staničnih hibridoma (PC60-d10S). Stanične populacije s visokom razinom ekspresije Fas-liganda sortirane su pomoću staničnog sortera, zatim je cDNA za Fas-ligand izolirana iz te populacije.

Aminokiselinska sekvenca Fas-liganda ukazuje da je Fas-ligand transmembranski protein tipa II i pripada TNF familiji. Rekombinantni Fas-ligand eksprimiran u COS stanicama inducira apoptozu u ciljnih stanica koje eksprimiraju Fas antigen. Northern blot analiza pokazuje da je Fas-ligand prisutan u aktiviranih splenocita i timocita uključenih u citotoksičnost posredovanu T stanicama i u nelimfoidnim tkivima kao što je testis (231).

#### **2.6.1.3.2. Citolitička i apoptotička aktivnost posredovana Fas antigenom**

Fas je apoptotičko signalna receptorska molekula na površini mnogih stanica u različitim tkivima. Površinski receptor Fas može provesti signal koji završava apoptotičkom smrću stanice (140). Fas također igra ulogu u nespecifičnoj CTL citotoksičnosti, dobivenoj nakon poliklonske aktivacije limfocita.

Citolitička aktivnost Fas-antitijela proučena je i upotrebom transformiranih staničnih linija koje eksprimiraju Fas antigen. Takve stanične linije u doza ovisnom odgovoru na anti-Fas antitijelo pokazuju polovični maksimalni odgovor upotrebom 0,1 mg/ml anti-Fas antitijela, a stanice su kompletno ubijene tijekom 24 satne inkubacije sa 1 mg/ml anti-Fas antitijela. Taj efekt anti-Fas antitijela na transformiranim mišjim stanicama sa eksprimiranim Fas antigenom je sličan efektu dobivenom upotrebom humanih staničnih linija kao što je A673 (rabdiosarkoma) i U-937 (histiocitni limfom) (231)

#### **2.6.1.3.3. Fas i Perforin u T staničnoj citotoksičnosti**

T stanična citotoksičnost studirana je kroz niz godina i definirana su dva mehanizma na molekularnom nivou: perforinom uvjetovan i drugi Fas uvjetovani. Perforin ovisan mehanizam pokazuje nisku citolitičku aktivnost za aktiviranu limfoidnu staničnu populaciju u perforin deficitnih miševa (102). Fas ovisan mehanizam je bio molekularno definiran kroz proučavanje

Fas molekule na ciljnim stanicama i nivoa Fas-liganda na efektorskim stanicama (231).

Oba mehanizma su antigen specifična (102). Slični dokazi su dobiveni sa ne-specifičnim stimulusima. Mononuklearne limfoidne stanice miša mogu biti inducirane sa Forbol-12 misitatom 13 acetatom (PMA) i jonomicinom za liziranje singeničnih ciljnih stanica preko Fas ovisnog mehanizma i sa ConA za liziranje nekih singeničkih ciljnih stanica sa mehanizmom koji nije Fas ovisan (248). Slični rezultati su dobiveni sa mononuklearnim leukocitnim stanicama perforin deficitnih miševa, što nameće zaključak da indukcija sa PMA i ionomicinom dovodi do citotoksičkih efektora prema singeničnim stanicama preko Fas ovisnog mehanizma (102). ConA stimulacija uvjetovala je u nekim eksperimentima lizu ciljeva sa mononuklearnim leukocitnim stanicama perforin deficitnih miševa. Polazeći od pretpostavke da postoje oba mehanizma liziranja, onda ConA stimulacija inducira oba, perforin ovisan i Fas ovisan mehanizam lize.

Fas ovisna citotoksičnost može biti inhibirana sa  $Mg^{2+}$ -EGTA. Naime pokazano je da je Fas ovisna citotoksičnost sa perforin deficitnim efektorima u prisustvu  $Mg^{2+}$ -EGTA svega 10% od totalne citotoksičnosti (102).

Ubilačka aktivnost perforin deficitnih/Fas intaktnih alogeničkih CTL-a (H-2<sup>b</sup> anti-H-2<sup>d</sup>) bila je testirana protiv H-2<sup>d</sup> (3T3 fibroblasti) i irelevantnih H-2<sup>k</sup> (H-2<sup>k</sup> embrionalni fibroblasti) H-2<sup>b</sup> (singenično stimulirani splenociti) ciljeva. Nakon 4-8 satne inkubacije visok nivo aktivnosti detektiran je jedino u H-2<sup>d</sup> ciljeva. Čak i u prisustvu PMA/ionomicina, za kojeg se zna da uvjetuje povećanje ekspresije Fas-liganda ili stimulaciju ciljnih stanica preko T-staničnog receptora, nije detektirana aktivnost spram ostalih ciljeva.. Nadalje, smanjeno izražavanje Fas receptora na stanicama inficiranim virusima može objasniti zašto perforin deficitni miševi neuspješno rješavaju limfocitni horiomenigitis virus (144) u prisustvu funkcionalnog Fas mehanizma lize. Moguće je da perforin/Fas ligand dvostruko deficitni miševi mogu imati daleko veće poteškoće u eliminaciji virusa nego perfori knock-

out miševi. To pokazuje da je Fas mehanizam u funkciji, ali nedovoljno efikasan da bi sam eliminirao virus u odsustvu perforina.

Uloga Fas-a u specifičnoj CTL citotoksičnosti dobivena je u mješanoj limfocitnoj kulturi od gld-splenocita (Fas-ligand negativni). Fibroblasti kao i Con-A stimulirani limfociti bili su lizirani sa fas-ligand deficitnim limfocitima. Citolitička aktivnost komparirana je sa dobivenom citolitičkom aktivnošću sa perforin deficitnim CTLs. Otprilike 10-30% ubilačke aktivnosti je nestalo u svim slučajevima. Normalni CTLs (perforin pozitivni/ Fas ligand pozitivni) kao i gld derivirani (Fas ligand negativni) pokazuju litičku aktivnost, perforin uvjetovanu. Za razliku, perforin deficitni CTLs bili su kompletno inaktivirani protiv Fas receptor bogatih fibroblasta ili limfocitnih ciljeva. Tako Fas i perforin ovisni putevi su odgovorni za sve navedene mehanizme ubijanja u eksperimentalnim uvjetima (144)

Eksperimenti pokazuju postojanje oba mehanizma, i to tako da je perforin ovisan mehanizam odgovoran za otprilike 2/3 ubilačke aktivnosti, a 1/3 pripada Fas ovisnom mehanizmu. Taj odnos vjerojatno varira *in vivo*. Ova dva mehanizma su komplementarna, jedan zahtjeva stanica-stanica kontakt, a drugi regulaciju izražavanja Fas-liganda u lizi Fas receptor pozitivnih stanica. Perforin ovisan put posredovan je egzocitozom granula, dok je Fas ovisan mehanizam lize posredovan vezanjem Fas liganda za Fas receptor na površini stanica. Oba mehanizma vjerojatno se preklapaju ali ne u potpunosti. Tako je perforin ovisan put vjerojatno više uključen u citolitičke procese prema inficiranim ili tumorski promjenjenim singeničnim stanicama ("promjenjeno vlastoto"), dok je Fas ovisan mehanizam uključen u regulatorne mehanizme ili direktno u citolitičke procese protiv aktiviranih singeničkih limfocita ("Vlastito aktivirano") (248). Tako su ova dva mehanizma odgovorna za tumorske, transplantacijske i ostale patološke promjene. Oba mehanizma induciraju apoptozu. Taj intracelularni ubilački mehanizam dominira u Fas posredovanoj lizi, dok je oštećenje membrane veće u perforin ovisnom putu lize (144). Oba ova mehanizma mogu se izmjenjivati tijekom evolucije u istim citolitičkim stanicama (144).

Perforin/Fas ligand dvostruko deficitni miševi progresivno gube tjelesnu težinu tijekom 10 tjedana života i završavaju letalno u 12-14 tjednu (226). Braun i suradnici (18) objavili su preživljavanje ovih miševa 4-5 mjeseci. Razlike u preživljavanju ovih miševa vjerojatno su uvjetovane razlikama u genima iz kojig su derivirani ovi miševi. Prisustvo samo jednog perforinskog alela produžava preživljavanje duže od 6 mjeseci (226). Ženke ovih miševa nisu sposobne za reprodukciju najvjerojatnije zbog limfocitne infiltracije u uterusu, dok su mužjaci fertilni ali kratko žive. Analizirajući citotoksičnost ovih miševa (226) uvidjelo se da su CTL-i tih miševa potpuno nemoćni u lizi P815 ciljeva ili P815-Fas putem perforina, Fas liganda ili bilo kojeg drugog mehanizma. Brza smrt perforin/Fas ligand dvostruko deficitnih miševa u prekidu limfoproliferacije putem kontrole antigenske prezentacije.

### 3.MATERIJAL I METODE

#### 3.1. KEMIKALIJE

Ethylenediaminetetraacetate- $\text{Na}_2$ -salt (EDTA), Merck  
ExtrAvidin alkalna fosfataza Sigma  
Fetal calf serum (FCS), Gibco  
Ficoll-Hypaque  
Lymphoprep (Nycomed)  
Gentamycin sulfat, Serva  
L-Glutamin, Merck  
Hepes, Serva  
Kalcij-klorid,  $\text{CaCl}_2$ , Kemika  
Kalij-dihidrogenfosfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Kemika  
Kalij klorid,  $\text{KCl}$ , Kemika  
Magnezij klorid-6-hidrat,  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , Kemika  
Merkaptoethanol, Merck 805740  
Mitomycin C, Serva  
Natrij-azid,  $\text{NaN}_3$ , Difco  
Natrij-dihidrogenfosfat-2-hidrat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , Kemika  
Natrij-hidroksid,  $\text{NaOH}$ , Kemika  
Natri klorid,  $\text{NaCl}$ , Kemika  
Na-benziloksikarbonil-L-lizin tiobenzil ester (BLT) (Sigma)  
Paraformaldehid, Kemika  
Penicillin, Grunenthal, Stolberg  
Propidium iodide, Serva  
Saponin, Sigma  
Streptomycin sulfat, Merck  
Tripano modriilo (Tripan blue), Serva  
Trypsin, Difco

### 3.2. MEDIJI I PUFERI

#### 1. Kompletan RPMI 1640 medij

Medij RPMI 1640 1L, L-glutamin 2 mM, 2-Merkaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$ , hepes (pH 7.2) 10mM, Penicilin  $1 \times 10^5$ U/l, Streptomycin sulfat 0.1 g/l, Gentamycin sulfat 0.05 g/l, Fetalni goveđi serum (FCS) 5-10%.

#### 2. PBS (puferirana fiziološka otopina)

Natrij klorid (NaCl) 140 mM, Kalij klorid (KCl) 2.7 mM, Natrij hidrogenfosfat-2-hidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) 6.5 mM, Kalij dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1.5 mM, Kalcij klorid ( $\text{CaCl}_2$ ) 0.7 mM, Magnezij klorid-6-hidrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0.7 mM.

#### 3. Medij za FACS (medij za protočni citometar)

PBS 1L, EDTA 10 mM, Herpes (pH 7.2) 20 mM, Fetalni goveđi serum 2%, Natrij azid ( $\text{NaN}_3$ ) 0.1%.

#### 4. Saponin pufer (za permeabilizaciju staničnih membrana)

PBS, 0.1% saponin, 2% fetalnog govedeg seruma, 1mM EDTA.

#### 5. 4% paraformaldehid (pH 7,4), za fiksaciju staničnih membrana.

Paraforaldehid 40g/L, Natrij hidrogenfosfat-2-hidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) 16,83 g/L, Natrij-hidroksid (NaOH) 3,85 g/L, Glukoza 5,4 g/L.

#### 6. Transfer pufer (prema Towbinu)

25 mM Tris; 192 mM Glicin; 20% Metanol.

#### 7. TBS (pH 7.5)

20 mM Tris-baza; 0,5 M NaCl;  $\text{H}_2\text{O}$



**8. TTBS (pH 7.5)**

20mM Tris-baza; 0.5 M NaCl; 0.05% Tween 20; H<sub>2</sub>O

**9. 2 x Sample pufer**

3% SDS; 2 x Upper tris; 400 mM DTT; H<sub>2</sub>O.

**10. BG**

0.03% Bromfenol blue; 40% Glicerol; H<sub>2</sub>O

**11. Pufer za renaturiranje**

5 M NaCl; Tris-Cl pH 7.0; DTT 100 mM; Urea; H<sub>2</sub>O

**12. Substrat BCIP/NBT**

BCIP ( Brom clor indol fosfat)- štok otopina otopljena u dimetilformamidu

NBT (Nitro blue tetrazolium)- 70%-tna otopina u dimetilformamidu  
Radna otopina: 0.38 M BCIP; 0.4 M NBT; 10mM MgCl<sub>2</sub>; TBS pH 9.5.

**13. Pufer za suspenziju stanica za Western-blotting**

0.1 M NaCl; 0.01 M Tris-CL (pH 7.6); 0.001 M EDTA (pH 8.0);  
1mg/ml aprotinina; 100 mg/ml PMSF neposredno prije upotrebe

**14. 2 x SDS sample pufer**

0.1 M Tris-Cl (pH 6.8); 0.2 M DTT; 4% SDS; 0.2% Bromfenol  
blue; 20% Glicerol

**15. Reages za blokiranje**

3% BSA u TTBS

### **3.3. LABORATORIJSKO PLASTIČNO POSUĐE**

Bočice za kulturu tkiva od 50 ml, Greiner

Petrijeve posude od 150 mm (Tissue culture grade quality), Greiner

Ploče za kulturu tkiva od 6 rupica (Tissue culture grade quality), Greiner

Kušalice od 1.5 ml (Eppendorf)

Kušalice za protočni citometar 12 x 70 mm (Falcon)

### **3.4. TKIVA I STANICE**

#### **3.4.1. Dobivanje limfocita periferne krvi**

Uzorak od 20ml periferne krvi uziman je ženama koje su bile davaoci tkiva decidue, neposredno prije uvođenja u anesteziju, iz kubitalne vene sterilnom brizgaljkom uz dodatak 0.5 ml heparina. Krv je naslojena na 10 ml Lymphoprep-a i centrifugirana na 800 x g kroz 20 min. Stanice nakupljene na površini Lymphoprep-a pakupe se sterilnom Pasteurovom pipetom, isperu dva puta u hladnom RPMI mediju i kultiviraju preko noći u RPMI 1640 mediju za kulturu s dodatkom 10% FCS-a u Petri-jevim posudama prikladnima za kulturu tkiva (Grainer, Germany), u inkubatoru na 37°C, u apsolutnoj vlažnosti i sa 5% CO<sub>2</sub> u atmosferi.

#### **3.4.2. Decidualno tkivo**

Decidualno tkivo dobiveno je tijekom namjernih prekida trudnoće na Klinici za ginekologiju i porodništvo KBC Rijeka. Sve žene čije je decidualno tkivo obuhvaćeno ovim ispitivanjem, imale su urednu reproduksijsku anamnezu i barem jedno živo rođeno dijete na terminu. Gestacijska dob trudnoća bila je 6-9 tjedana, što je određeno prema datumu zadnje menstruacije, ginekološkim palpatornim nalazom i ultrazvučnim nalazom.

#### **3.4.2.1. Dobivanje suspenzije decidualnih leukocita iz decidualnog tkiva**

Odmah po uzimanju decidualno tkivo je pohranjeno u hladnom i sterilnom RPMI 1640 mediju (Imunološki zavod, Zagreb) dopremano je na Zavod za fiziologiju i imunologiju. Svi daljnji postupci vršeni su u sterilnim uvjetima, u komori s laminarnim protokom zraka. Po odstranjenju krvnih ugrušaka tkivo smo nekoliko puta isprali u hladnom RPMI 1640. Nakon što smo pažljivo odstranili eventualne priležeće dijelove trofoblasta i plodovih ovoja, decidualno tkivo smo izrezali na komadiće veličine oko 2x2 mm. Komadiće decidualnog tkiva u tripsinskom mediju (0,125 % trypsin-Difco+EDTA) sterilno smo prebacili u tikvicu s magnetom, te podvrgli digestiji u trajanju od 90 minuta na 37°C, uz neprekidno miješanje na magnetskoj miješalici. Svakih 30 minuta dodavali smo po 10 ml svježeg tripsinskog medija do ukupnog volumena od 50 ml na približno 10 g decidualnog tkiva. Nakon 90 minuta proces tripsinske digestije zaustavljali smo dodavanjem 5 ml (10%) normalnog AB seruma pripremljenog od više davalaca. Dobivenu suspenziju propuštali smo dva puta kroz najlonsku mrežicu, pažljivo izbjegavajući tkivni detritus. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 600 x g, stanice smo dva puta ispirali u hladnom mediju za kultiviranje, a zatim resuspendirali u 5 ml medija, naslojavali na Ficoll-Hypaque i centrifugirali kroz 20 minuta na 800 x g. Izdvojeni prsten stanica pažljivo smo pokupili i isprali dva puta, te odredili vijabilnost stanica tripsinskim modrilom. Vijabilnost je uvijek bila veća od 95%.

#### **3.4.2.2. Kultiviranje decidualnih leukocita**

Decidualni leukociti kultivirani su u kompletnom RPMI 1640 s dodatkom pencilina, streptomicina, tiamulina i L-glutamina, te obogaćenom s 5% telećeg fetalnog seruma (FCS fetal calf serum, Serva) u koncentraciji od  $2 \times 10^6$  stanica/ml. Stanice su pohranjene u plastične bočice zapremine 50 ml (Grainer, Germany) u inkubatoru na 37°C u optimalnoj vlažnosti i

sa 5% CO<sub>2</sub> u atmosferi. Nakon 18 satnog kultiviranja, neadherentna frakcija decidualnih leukocita (decidualni limfociti) pokupi se iz bočice za kultiviranje nježnim pipetiranjem, a adherentne nakon tripsinizacije pod kontrolom mikroskopa. Tako pokupljene stanice isperu se dva puta u hladnom RPMI 1640 i koriste u daljnjim testovima.

### **3.5. ODREĐIVANJE STANIČNIH ANTIGENA PROTOČNOM CITOMETRIJOM**

Tijekom postupka pripreme stanica za protočnu citometriju stanice su držane na ledu, u plastičnim epruvetama sa okruglim dnom ili Eppendorf kontejnerima od 1,5 ml. Suspenzija stanica periferne krvi i decidualnih limfocita je resuspendirana i isprana u hladnom FACS-mediju. Sve inkubacije su izvedene u ukupnom volumenu od 0,2 ml, a sva ispiranja s 1 ml hladnog FACS medija (za nepermeabilizirane stanice) ili Saponinskog pufera (za permeabilizirane stanice). Način obilježavanja stanica ovisio je o vrsti monoklonskih antitijela korištenih u postupku i cilju koji se želio postići obilježavanjem.

#### **3.5.1. Fiksacija i permeabilizacija staničnih membrana**

Pripremljenu suspenziju stanica jednom smo isprali i resuspendirali u hladnom FACS mediju. Podašenoj koncentraciji stanica od  $1 \times 10^6/100\mu\text{l}$ , dodali smo 100  $\mu\text{l}$  4% otopine paraformaldehida, radi stabilizacije stanične membrane. Nakon inkubacije od 8 minuta na sobnoj temperaturi za decidualne limfocite i 10 minuta za limfocite periferne krvi, stanice smo ispirali u hladnom FACS mediju, te resuspendirali u 100  $\mu\text{l}$  0.1% saponinskog pufera. Nakon inkubacije od 20 minuta na sobnoj temperaturi, primarna protitijela smo dodavali direktno u suspenziju stanica u saponinskom puferu. Treba napomenuti da smo za svaki uzorak

permeabiliziranih stanica, za kontrolu permeabilizacije uzimali uzorak netretiranih (paraformaldehidom i saponinskim puferom) stanica.

### **3.5.2. Direktna imunofluorescencija**

Stanice smo resuspendirali u FACS mediju u koncentraciji od  $1 \times 10^6$  stanica/100 $\mu$ l i pomiješali s istim volumenom razrijeđenog monoklonskog protutijela, konjugiranog s fluorescentnom bojom. U svim testovima protutijela smo otopili u FACS mediju, u koncentraciji od 0,5-1 $\mu$ g antitijela po probi. Nakon inkubacije od 30-45 minuta na ledu, stanice smo ispirali dva puta s 1 ml hladnog FACS medija i resuspendirali u istom volumenu FACS medija, koji je sadržavao 1  $\mu$ g/ml propidij jodida. Treba napomenuti da propidij jodid nismo dodavali u suspenziju stanica koje su predhodno bile fiksirane i permeabilizirane. Tako pripremljene stanične uzorke analizirali smo protočnom citometrijom, uz konstantne parametre FSC (parametar veličine stanice), SSC (parametar granularnosti stanica), FL1 (intenzitet fluorescencije GAM-FITC-a) i FL2 (intenzitet fluorescencije PE)

### **3.5.3. Indirektna imunofluorescencija**

Indirektna metoda imunofluorescentnog obilježavanja zahtijeva više vremena, ali joj je prednost u odnosu na direktnu što povećava osjetljivost testa i tako omogućuje otkrivanje antigena čija je gustoća vrlo malena. Izvodi se u dvije faze, od kojih je prva identična kao u metodi direktne imunofluorescencije. Razlika je jedino u kvaliteti protutijela korištenih u prvoj fazi: u indirektnoj imunofluorescenciji primarna protutijela nisu konjugirana s fluorescentnom bojom, već su neobilježena. U drugoj fazi nakon ispiranja nevezanih primarnih protutijela u FACS mediju, stanice smo ispirali 2 puta u hladnom FACS mediju, a zatim smo u suspenziju dodali fluorescentnu boju GAM-FITCS u koncentraciji 0,5-1 $\mu$ g po probi,

te inkubirali na ledu daljnjih 30 minuta. Nakon inkubacije, suvišak nevezane fluorescentne boje smo isprali u 1 ml hladnog FACS medija (2x) i resuspendirali u istom volumenu FACS medija s 1 ug/ml propidij jodida.

#### **3.5.4. Istovremeno bojenje dvaju površinskih antigena**

Metodom dvostrukog bojenja moguće je dokazati prisustvo dva različita biljega na istoj stanici, koristeći test-protutijela konjugirana direktno ili indirektno s različitim fluorokromima. Postupak ovisi o raspoloživoj kombinaciji antitijela. Ako su oba primarna protutijela konjugirana s fluorokromom, stanice se obilježavaju po principu direktne imunofluorescencije, tj. oba protutijela se dodaju istovremeno, u koncentraciji od 0,5-1 $\mu$ g po probi. Ako je jedno antitijelo konjugirano s fluorokromom, a drugo je nekonjugirano, tada se obilježavanje vrši po principu indirektno imunofluorescencije. U našem slučaju prvo primarno protutijelo je bilo direktno konjugirano sa PE, dok je drugo primarno protutijelo bilo nekonjugirano, pa smo ga vizualizirali inkubiranjem sa sekundarnim protutijelom, koje je bilo konjugirano sa FITC-om (Anti-zečji-IgG-FITC). Konačno smo stanice resuspendirali u 1 ml FACS medija koji je sadržavao 1 $\mu$ g/ml propidij jodida, te 10.000 stanica iz svakog uzorka analizirali protočnom citometrijom.

#### **3.5.5. Istovremeno obilježavanje dvaju antigena, unutarstaničnog (perforina) i površinskog (membranski antigen)**

Ovom metodom moguće je dokazati prisustvo dva antigena, od kojih je jedan prisutan u stanici, a drugi na površini stanice. Prethodno fiksirane i permeabilizirane stanice, resuspendirali smo u 100  $\mu$ l saponinskog pufera u koncentraciji  $1 \times 10^6$  stanica po probi, te inkubirali 30-45 minuta s primarnim protutijelom (anti-humani perforin). Primarno antitijelo smo

predhodno razrijedili u saponinskom puferu, tako da je finalno razrijedenje bilo 5 ug/probi. Stanice smo isprali 2 puta u saponinskom puferu, a zatim smo suspenziji dodali sekundarno protutijelo konjugirano s fluorokromom (GAM-FITC), u koncentraciji 0,5-1µg/ po probi, te inkubirali daljnjih 30-45 minuta na +4°C. Stanice smo isprali 2 puta u saponinskom puferu, te resuspendirali u 1 ml PBS-a i ostavili daljnjih 10 minuta na +4°C, kako bi se oporavile stanične membrane. Na cetrifugiranjem istaložene stanice dodali smo primarno protutijelo za obilježavanje membranskih antigena. Nadalje je slijedio postupak kao u direktnoj ili indirektnoj imunofluorescenciji, kojeg je diktirala kvaliteta upotrebljenog primarnog antitijela. Na kraju smo stanice resuspendirali u 1 ml FACS medija, te 10.000 stanica svakog uzorka analizirali smo protočnim citometrom.

### 3.6. WESTERN BLOT

#### 3.6.1. Liziranje stanica za Western blot

Na talog suspenzije stanica doda se pufer za resuspendiranje stanica i dobro resuspendira. U tu suspenziju doda se SB sa PMSF i dobro mućka 2 min. Nakon toga suspenzija mora stajati na +4°C 10 min, a zatim se centrifugira 5min/ max. broj okretaja. Poslije grijanja na 95°C/ 5 min. doda se BG i alikvotira po 50ml. Količina upotrebljenih pufera za liziranje ovisi o početnom broju stanica koje liziramo. Tako:

Broj stanica u milionima : 2 = broj uzoraka

Broj uzoraka x 50ml = konačni volumen

1/4 konačnog volumena = volumen suspenzion pufera

2/4 konačnog volumena = SB + PMSF

1/4 konačnog volumena = BG

### 3.6.2. Pripreme gelova za Western blot

Za Western blot analizu bilo je potrebno pripremiti gel koji se sastoji od dva sloja. Donji sloj gela sastoji se od 30% acrilamida/0,8% bisakrilamida, 4 x Tris-Cl/SDS (pH 8,8), 10% amonijevog persulfata, TEMED i H<sub>2</sub>O. Tako pripremljenu suspenziju donjeg gela izlili smo između predhodno pripremljenih stakala i na vrh gela nasložili 1 ml 0,1% SDS-a. Kada se gel skruti površina se ispere sa H<sub>2</sub>O i pipetom se nalije drugi sloj gela koji se sastoji od: H<sub>2</sub>O, 4 x Tris-Cl/SDS (pH 6,8), 30% acrilamida, 10% APS i TEMED.

### 3.6.3. Elektroforeza i Western transfer

Western blot analiza izvodi se u nekoliko faza. Prvu fazu čini elektroforeza uzoraka nanesenih u udubine ,učinjene češljem,na gelu. Snaga elektroforeze dobije se računski tako da 1000V podijelimo sa dužinom trajanja elektroforeze u satima. Obično smo elektroforezu vršili preko noći. Drugi dan smo pažljivo oslobodili gel i renaturirali ga 45 minuta. Nakon toga se gel ispere u transfer puferu i u istom puferu inkubira 30 minuta. Za to vrijeme smo pripremili 4 hamer papira i 1 nitrocelulozni veličine postojećeg gela. Namočena nitroceluloza u TBS-u se pažljivo podvuče pod gel, a zatim na isti način i dva hamer papira. Gel se još prekrije sa dva namočena hamer papira i prenese u aparat za transfer tako da nitroceluloza bude okrenuta prema pozitivnoj elektrodi. Cijeli sistem za transfer se napuni transfer puferom i pusti da se ekvilibrira 5 minuta, nakon čega se uključi struja i vodeno hlađenje. Transfer (druga faza) je trajao 2 sata.

Nitroceluloznu membrabu na koju smo izblotirali proteine isprali smo 5-10 min. u TTBS puferu. Zatim je slijedilo blokiranje sa reagensom za blokiranje 60-180 min. uz često miješanje. Membrane je nakon toga potrebno 3 x 15 min. isprati u TBS + 0.05%-0.1% Tween 20 + 1% BSA.



Potom je slijedilo obilježavanje sa primarnim protutijelom (anti-TJ6) uz istovremeno obilježavanje sa izotipskim kontrolnim protutijelom razrijeđenim u TBS + 0.05%-0.1% Tween 20 + 1% BSA u omjeru 1:1000. Potrebno je pripremiti 0.5 ml takve otopine po  $\text{cm}^2$  membrane. Obilježavanje sa primarnim protutijelom traje 1-2 sata. Membranu nakon toga smo isprali sa TBS 3 x 15 minuta. Slijedila je 1-2 satna inkubacija sa sekundarnim protutijelo-enzim konjugatom (Protein-A alkalna fosfataza) koje smo razrijedili u TBS-u u omjeru 1:1000. Nakon 2 x 15 minutnog ispiranja, membrane smo isprali u TBS bez Tweena 20. Membrane se zatim prekriju sa otopinim substrata (BCIP/NBT) i inkubira u mraku uz stalnu kontrolu da nebi došlo do prebojenosti. Inkubacija se zaustavlja sa EDTA.

### **3.7. STIMULACIJA LPK i DL SA ANTI-CD3 mAt, PHA i rIL-2**

18-satnu stimulaciju LPK i DL vršili smo u 6-rupičastim pločama sa ravnim dnom za kultivaciju tkiva, tako da je broj stanica uvijek bio podešen na 1 milion/ml. U određene rupice dodavali smo anti-CD3 mAt (OKT-3, Orto) u koncentraciji 0,5 mg/ml; PHA u koncentraciji 1 mg/ml, te rIL-2 100IU/ml. U svim pokusima radili smo nulte kontrole (bez kultivacije 0-to vrijeme), te kontrole gdje su LPK i DL bili samo kultivirani kroz 18 sati.

Nakon 18-satne kultivacije u inubatoru, u optimalnoj vlažnosti na 37°C i sa 5% CO<sub>2</sub>, stanice su pokupljene pipetom i isprane 2 puta u hladnom RPMI, te na taj način pripremljene za imunofluorescentno obilježavanje.

### **3.8. KULTIVIRANJE LPK i DL SA SINGENIČKIM I ALOGENIČKIM DECIDUALNIM ADHERENTNIM STANICAMA**

Nakon što smo iz bočica za kultivaciju tkiva pokupili neadherentne stanice (DL), na zaostale decidualne adherentne stanice (makrofage) dodali smo 2 ml predhodno zagrijanog (37°C) tripsina i pod kontrolom mikroskopa odredili dužinu trajanja tripsinizacije. Tripsinizacija je obično trajala 1-2 min. Naime, tripsinizacija je trajala do odljepljivanja decidualnih makrofaga od plastične podloge. Zatim smo zaustavili tripsinizaciju sa 2 ml AB seruma. Tako dobivene makrofage isprali smo 3 puta u hladnom RPMI i dodavali ih u određene rupice na 6-rupičastoj ploči za kultivaciju tkiva, tako da je omjer decidualnih makrofaga sa LPK i DL bio 1:1. U nekim pokusima decidualne makrofage smo zakočili inkubacijom sa Mitomicinom C/45 min.

Nakon 18-satne kultivacije u inkubatoru, u optimalnoj vlažnosti na 37°C i sa 5% CO<sub>2</sub>, pažljivo smo ispipetirali LPK i DL, isprali ih 2 puta u hladnom RPMI i pripremili za imunofluorescentno obilježavanje.

### **3.9. STATISTIČKA OBRADA I PRIKAZIVANJE REZULTATA**

Statistička obrada rezultata izvršena je pomoću standardnog kompjutorskog programa za t-test. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost uz naznačenu standardnu devijaciju i statističku značajnost. Korišteni su slijedeći kompjutorski programi za prikazivanje rezultata: Sygma plot 40, Carizma i Word for Window.

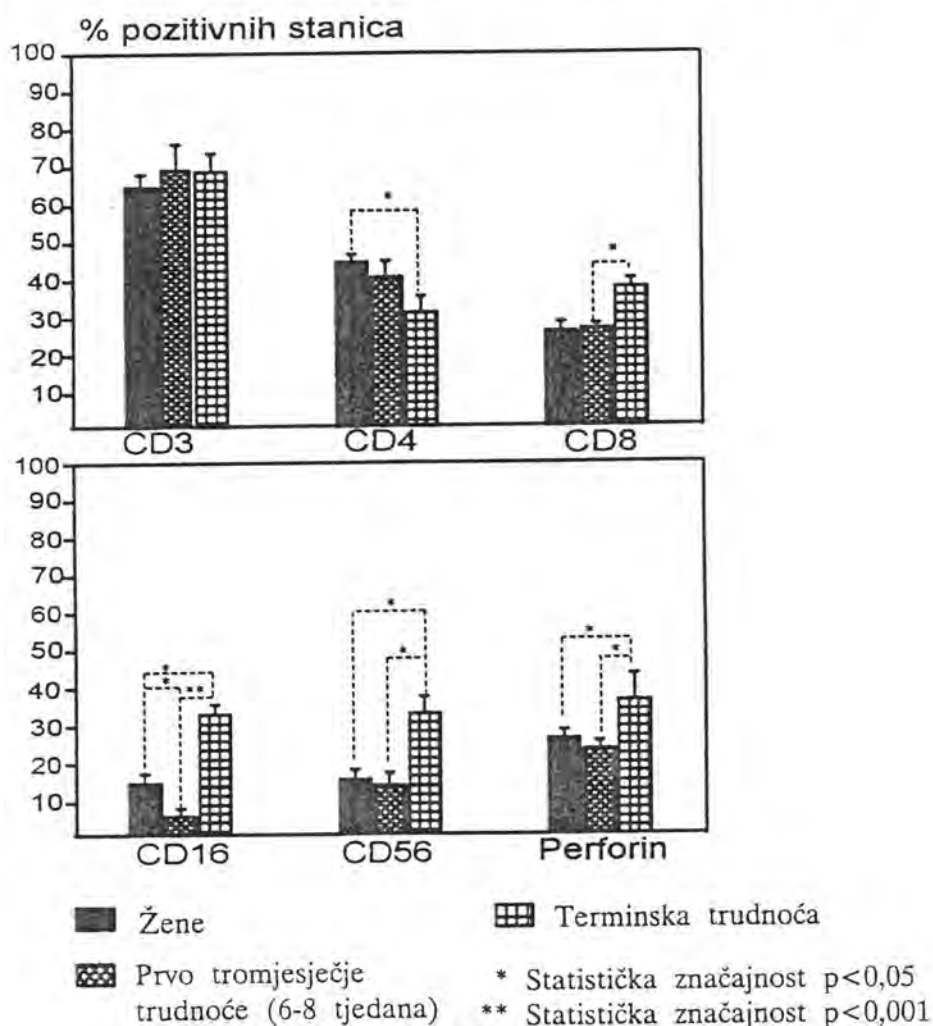
## 4. REZULTATI

### 4.1 Promjene fenotipskih karakteristika limfocita periferne krvi (LPK) tijekom trudnoće:

#### Porast NK i citotoksičkih T limfocita na termin poroda

Analizirajući fenotipska obilježja LPK tijekom trudnoće uočili smo brojne razlike između prvog tromjesečja trudnoće i LPK na terminu poroda. Najveće, statistički značajne, promjene (porast na termin poroda) uočili smo za NK stanične markere ( CD16<sup>+</sup>= 5,2% vs. 33,7%; CD56<sup>+</sup>= 13,6% vs. 33,9%), ukupan broj perforin<sup>+</sup> stanica (24,8% vs. 37,2% LPK), te za T citotoksičke limfocite ( CD8<sup>+</sup>= 25,7% vs. 38,5% LPK) (slika 3)

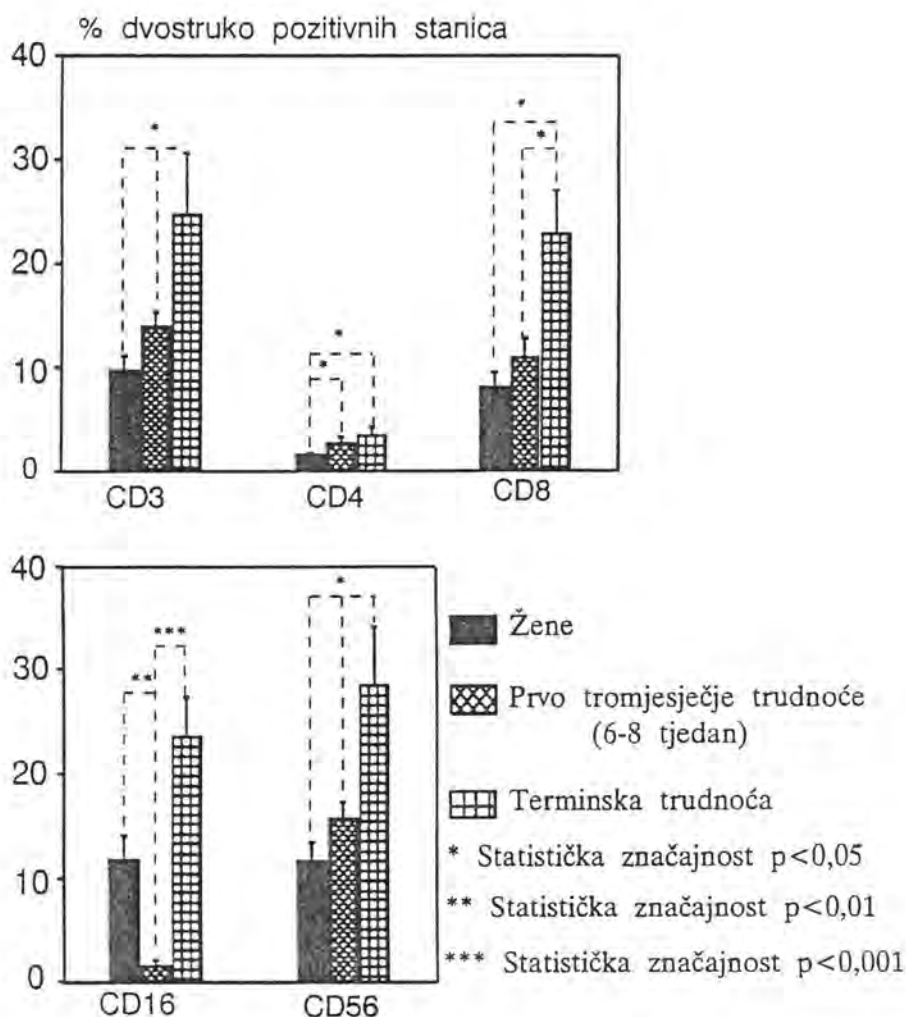
Slika 3. Fenotipske karakteristike limfocita periferne krvi



Zanimljiva je dinamika izražavanja CD16<sup>+</sup> LPK (slika 3) kod negravidne, gravide u prvom tromjesječju trudnoće, te na terminu poroda. Uočava se značajan pad CD16<sup>+</sup> LPK u prvom tromjesječju trudnoće (oko 5%) u odnosu na negravidne (oko 15%), te višestruki porast CD16<sup>+</sup> LPK na terminu poroda (oko 30%).

Analizom dvostruko pozitivnih (perforin<sup>+</sup> CD antigen<sup>+</sup>) LPK (slike 4, 5a i 5b) također je uočen značajan pad P<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> LPK u prvom tromjesječju trudnoće u odnosu na LPK negravidna (12,3% vs. 2,2%), te deseterostruko povećanje na terminu poroda (oko 23%).

**Slika 4. Dvostruko pozitivni (perforin<sup>+</sup> CDmarker<sup>+</sup>) limfociti periferne krvi / 10000 stanica**



Porast perforin pozitivnih stanica među CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup> (slika 4) LPK na termin poroda u odnosu na LPK prvog tromjesječja trudnoće popraćen je i porastom brojčanosti perforinskih molekula (AFI za perforin) u P<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> i P<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, ali ne i u P<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> LPK na termin poroda. Naime, uočena dinamika značajnog pada postotne zastupljenosti P<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> LPK u prvom tromjesječju trudnoće u odnosu na LPK negravidne, te značajan porast iste podvrste na terminu poroda (Slika 4 i 5a i 5b) nije u potpunosti popraćena istovjetnom dinamikom promjena brojčanosti perforinskih molekula u P<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> LPK. Tako je značajan pad ove podvrste stanica popraćen i značajnim (p<0.05) padom AFI za perforin u prvom tromjesječju trudnoće, ali značajan porast iste podvrste LPK na termin poroda nije promijenio sadržaj perforinskih molekula (AFI za perforin) unutar P<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> LPK (Tablica 1).

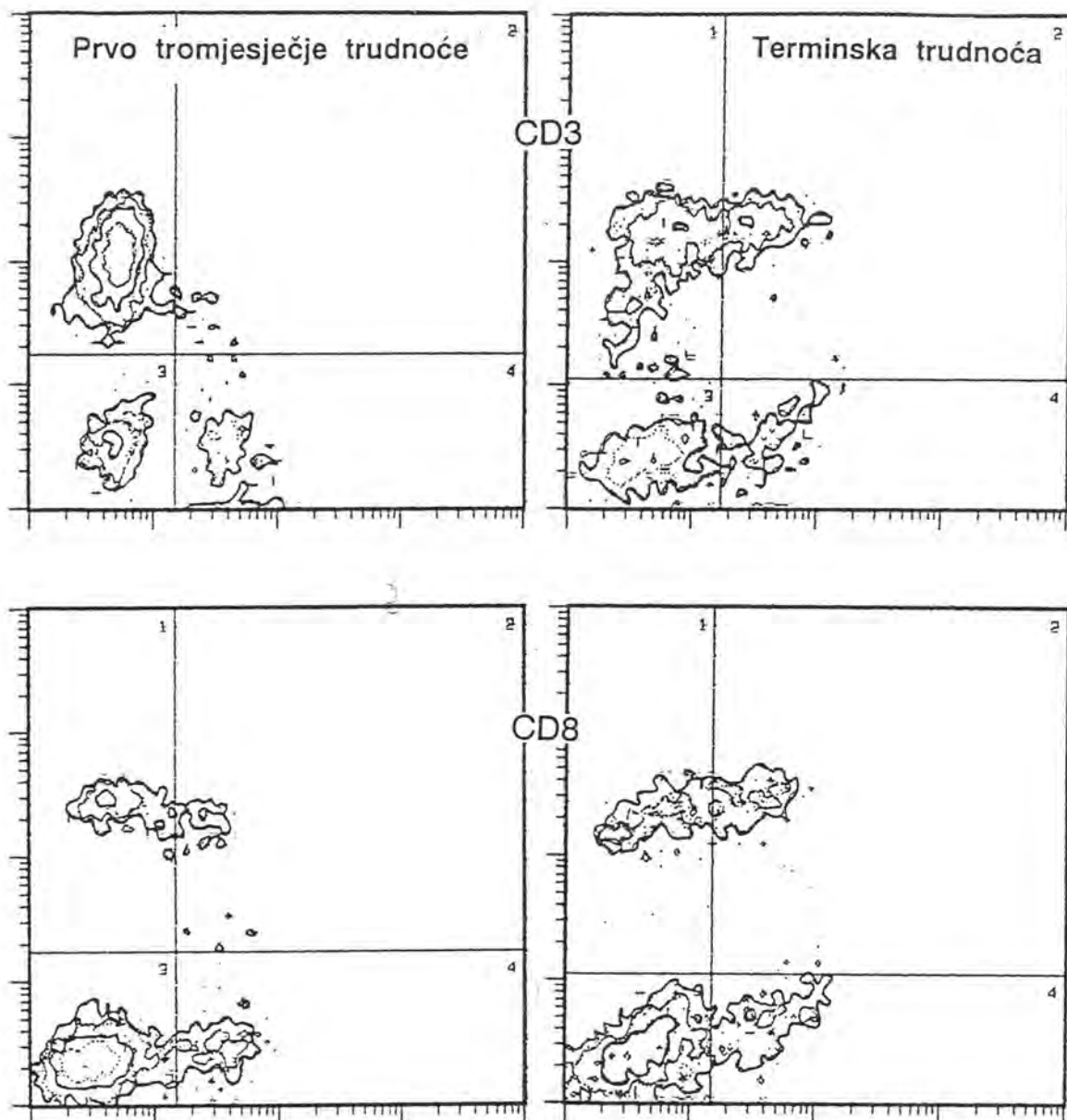
**Tablica 1. Srednji intenzitet fluorescencije za perforin (AFI za P) u dvostruko pozitivnih (P<sup>+</sup> CD marker <sup>+</sup>) LPK**

		N	X	±	SE**	Nivo značajnosti
P <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	*NP <sup>1</sup>	8	54.5	±	18.1	
	*FTP <sup>2</sup>	13	58.4	±	5.5	1:3 p<0.05
	*TP <sup>3</sup>	6	30.9	±	5.1	2:3 p<0.05
P <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	NP <sup>1</sup>	8	55.3	±	11.2	
	FTP <sup>2</sup>	13	38.1	±	4.3	1:2 p<0.05
	TP <sup>3</sup>	6	68.7	±	19.1	2:3 p<0.05
P <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	NP <sup>1</sup>	12	112.3	±	28.6	
	FTP <sup>2</sup>	13	68.6	±	8.6	1:2 p<0.05
	TP <sup>3</sup>	6	68.7	±	15.8	1:3 p<0.05
P <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	NP <sup>1</sup>	8	66.9	±	11.2	
	FTP <sup>2</sup>	13	55.3	±	8.3	2:3 p<0.05
	TP <sup>3</sup>	6	79.5	±	12.5	

\*NP= Negravide; \*FTP= Prvo tromjesečje trudnoće \*TP= Terminska trudnoća

\*\* Srednja vrijednost ± standardna pogreška

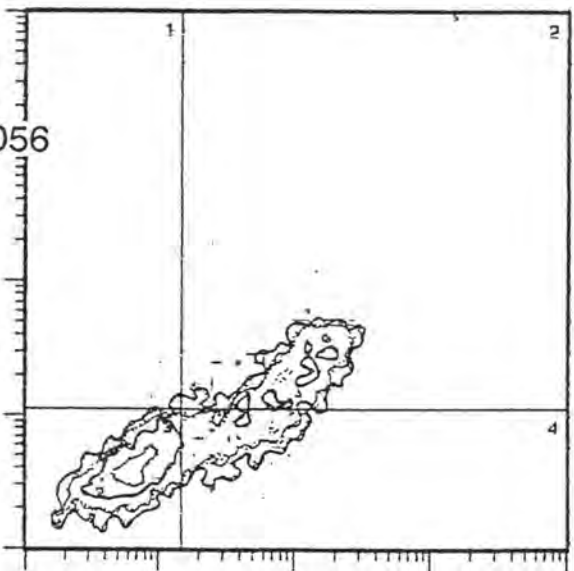
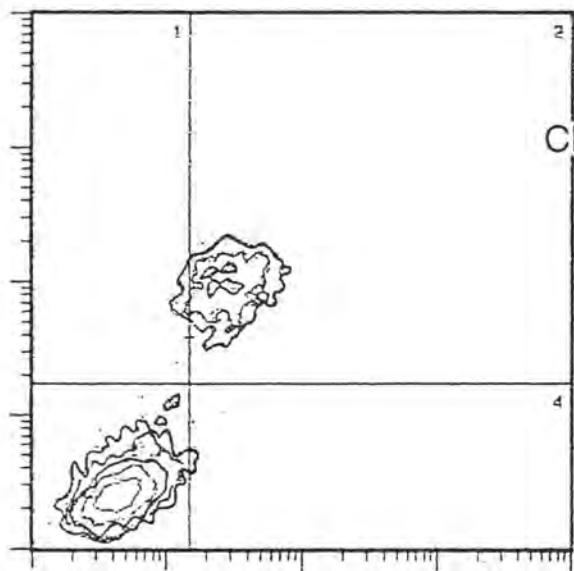
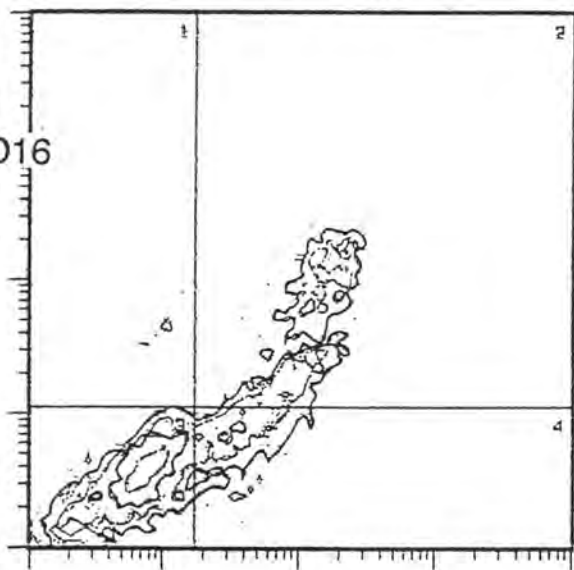
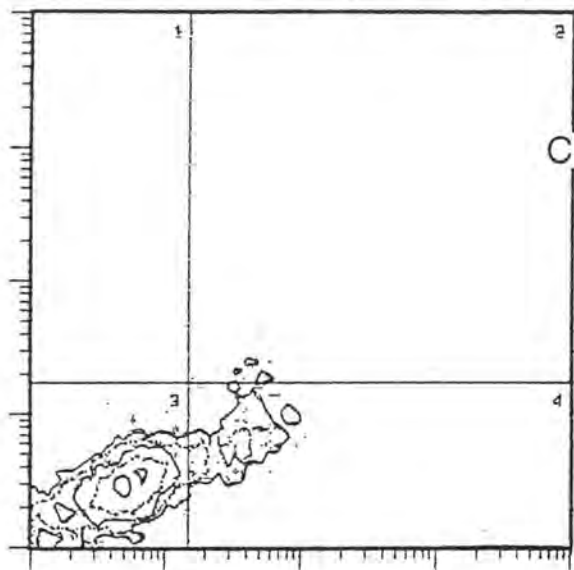
Slika 5a. Analiza protočnim citometrom dvostruko pozitivnih (perforin+CDmarker+) limfocita periferne krvi / 10.000 stanica



Slika 5b. Analiza protočnim citometrom dvostruko pozitivnih (perforin+CDmarker+) limfocita periferne krvi / 10000 stanica

Prvo tromjesječe trudnoće

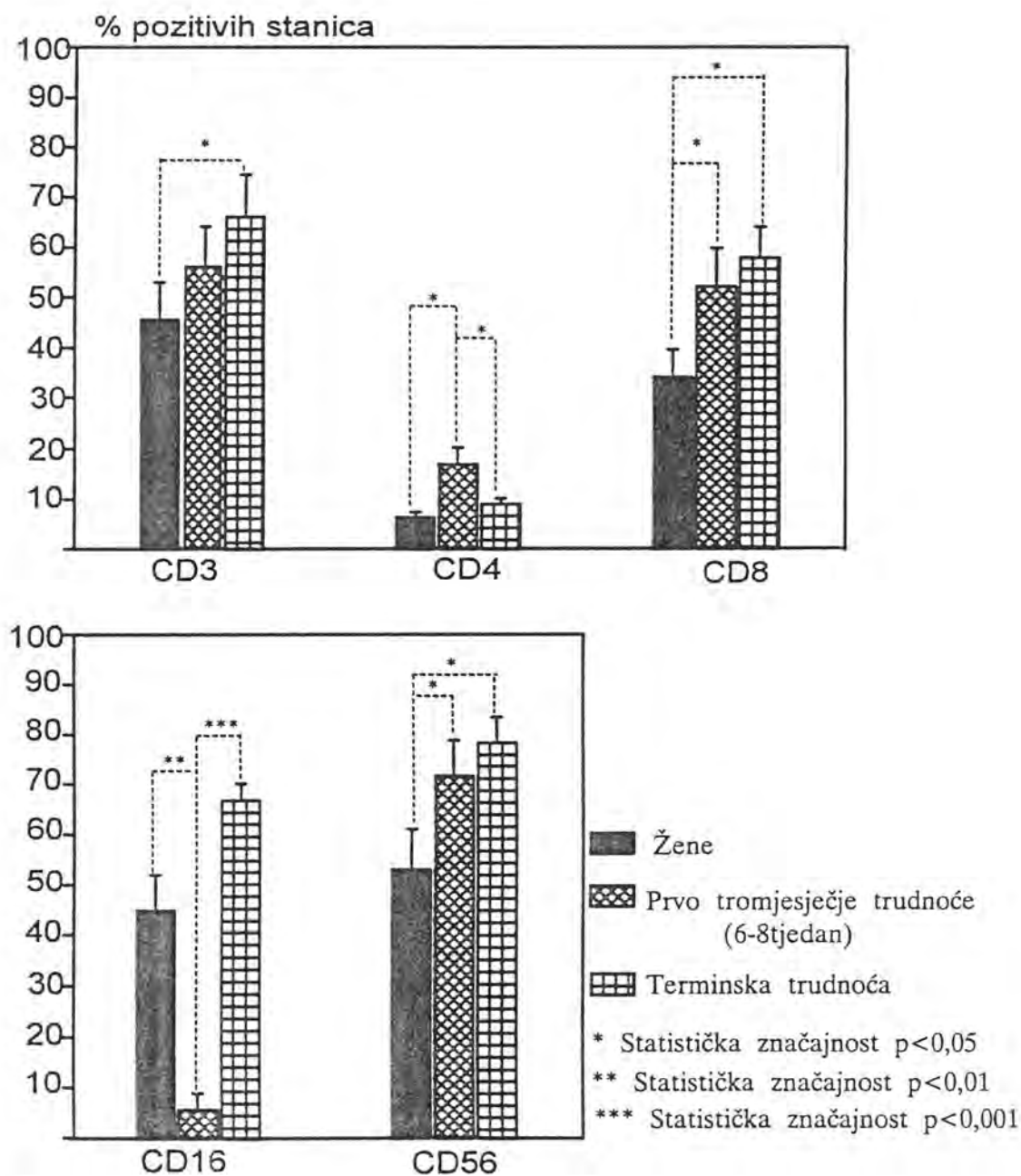
Terminska trudnoća



## 4.2 Perforin pozitivni limfociti periferne krvi mijenjaju fenotipska obilježja tijekom trudnoće

Analizirajući protočnim citometrom samo perforin pozitivne LPK dobivene su značajne razlike u njihovim fenotipskim obilježjima tijekom trudnoće (slika 6)

Slika 6. Fenotipske karakteristike perforin pozitivnih limfocita tijekom trudnoće





Dominantnu populaciju perforin pozitivnih stanica u prvom tromjesječju trudnoće čine CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> stanice, dok je na termin poroda uočena dominacija CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> stanica (Slika 6). Na istoj slici može se uočiti da zbroj CD3<sup>+</sup>P<sup>+</sup> (oko 57% u prvom tromjesječju trudnoće; oko 65% na termin poroda) i CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup> (oko 73% u prvom tromjesječju trudnoće; oko 79% na terminu poroda) u trudnoći prelazi 100%, što ukazuje na djelomično preklapanje ovih dviju podvrsta perforin pozitivnih LPK u trudnoći. Taj nalaz sugerira da je dio CD3<sup>+</sup> LPK u trudnoći CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup>.

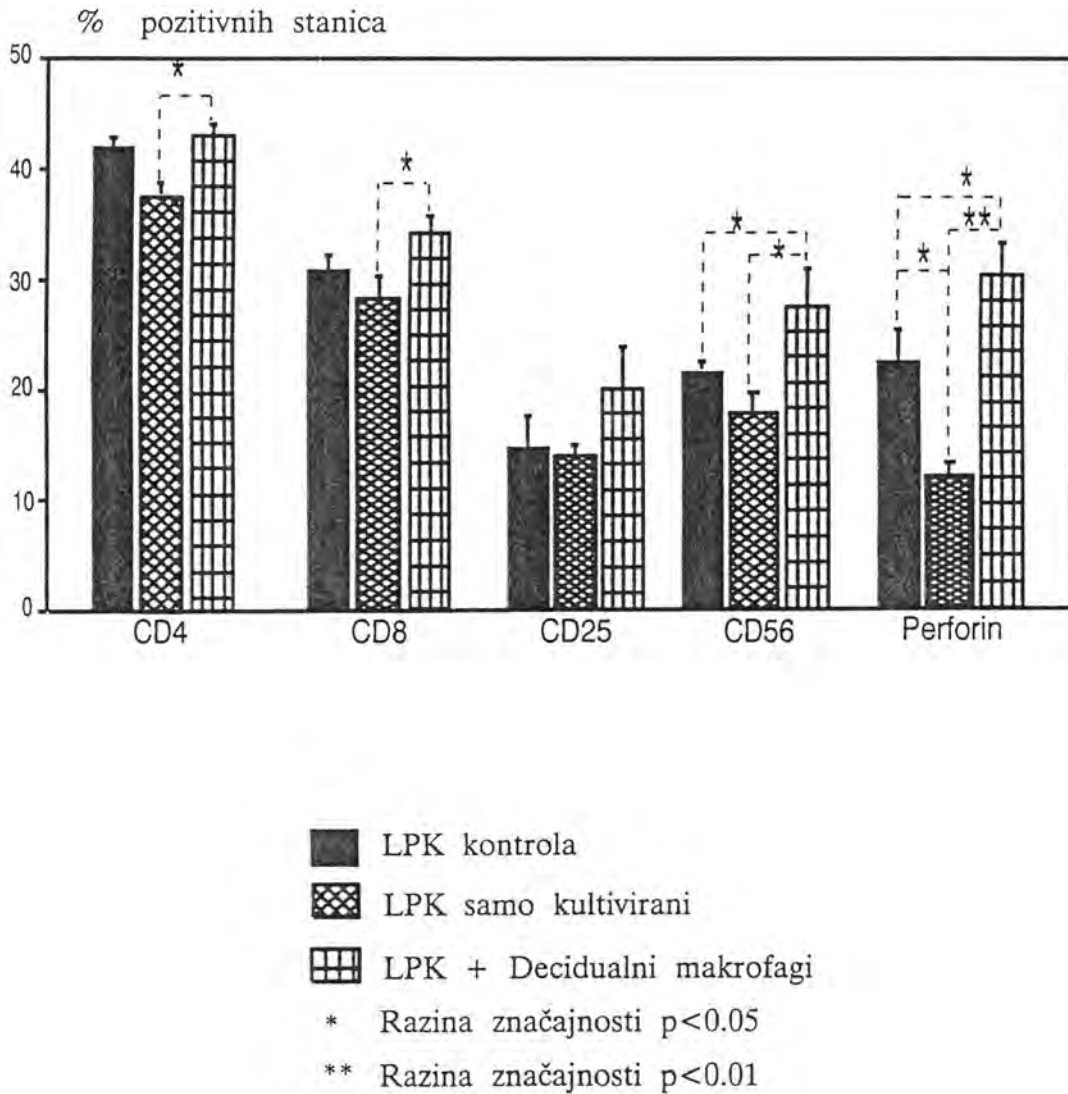
#### **4.3 Decidualni makrofagi tretirani mitomicinom sudjeluju u održavanju perforina u perforin pozitivnim stanicama**

Istraživanja stanica koje sadrže perforin u *in vitro* uvjetima susreću se sa problemom prolongiranog kultiviranja. Zato nije neobično da se istraživači bave proučavanjem idealnih uvjeta (*in vitro*) u kojima bi se perforin pozitivne stanice mogle održavati i dugoročnije proučavati.

U pokusima istraživanja regulacije ekspresije i otpuštanja perforina primjetili smo da se u prisustvu decidualnih makrofaga perforin, što se odnosi i na postotak perforin pozitivnih stanica i intenzitet zastupljenosti (AFI za perforin) u stanicama koje ga konstitutivno izražavaju, dobro održava u prisustvu decidualnih makrofaga. Naime, kao što pokazuje slika 7, ako kultiviramo limfocite periferne krvi negravidna kroz 18 sati sa ili bez alogeničkih decidualnih makrofaga, koje smo predhodno zakočili mitomicinom, dolazi do dobrog održavanja, pa i do značajnog povećanja postotka perforin pozitivnih stanica. Naime, 18 satna kultivacija uvjetuje pad perforin pozitivnih stanica sa 21,5% na 12,5%, dok u uzorku LPK kultiviranih sa mitomicinom zakočenim decidualnim makrofagima dolazi i do porasta perforin pozitivnih stanica (29,4%). Ista slika pokazuje da taj porast prati i značajniji porast ( $p < 0,05$ ) CD56<sup>+</sup> stanica (27,5% v.s. 20,5%). Pitanje

koje se nameće je: U kojim staničnim podvrstama je lociran porast perforina?

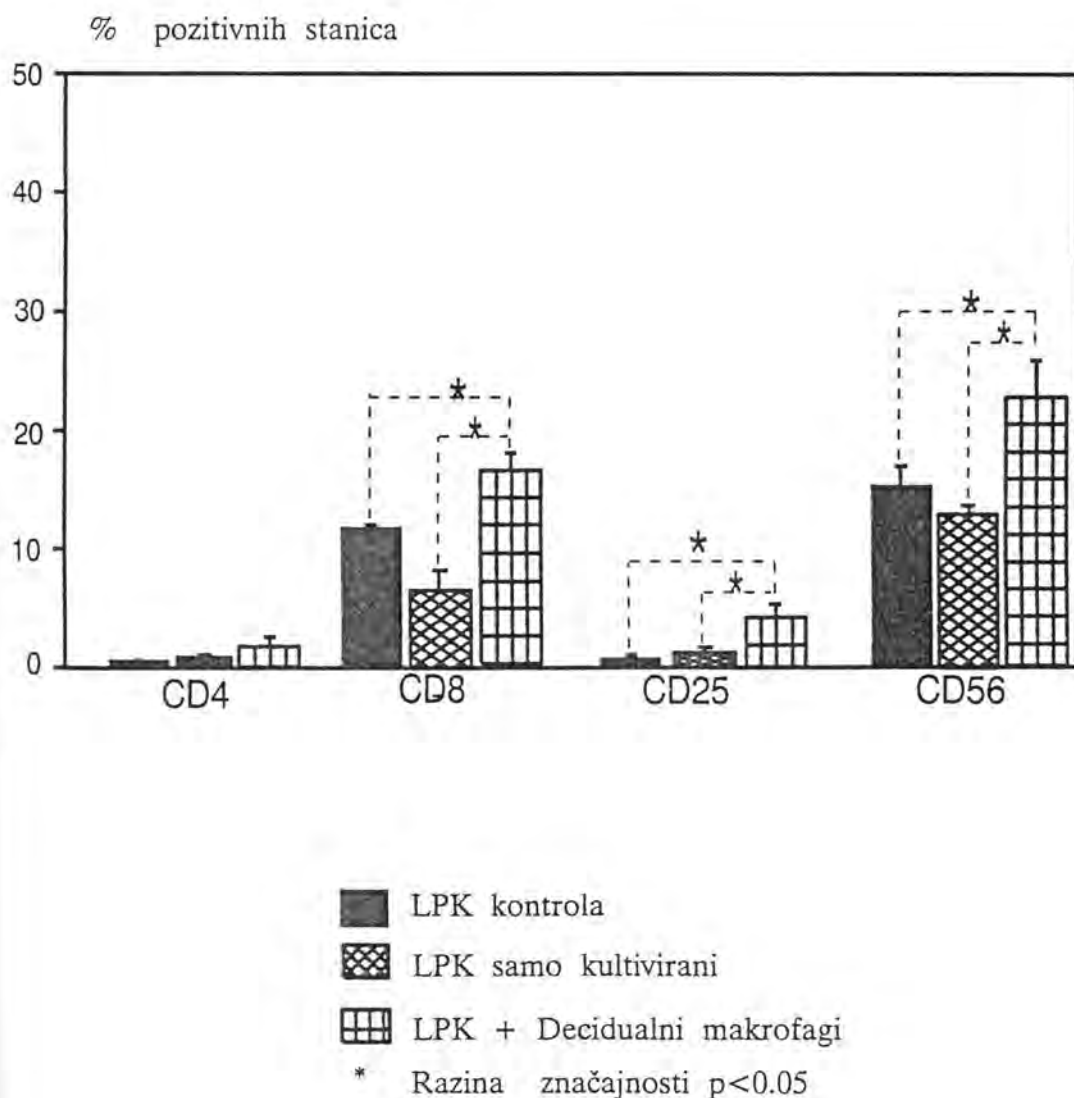
**Slika 7. Fenotipske karakteristike LPK negravidna nakon 18- satne kultivacije i kokultivacije sa mitomicinom zakočenim decidualnim makrofagima**



#### 4.4 Decidualni makrofagi stimuliraju porast perforina u NK i citotoksičkim limfocitima T periferne krvi negravida

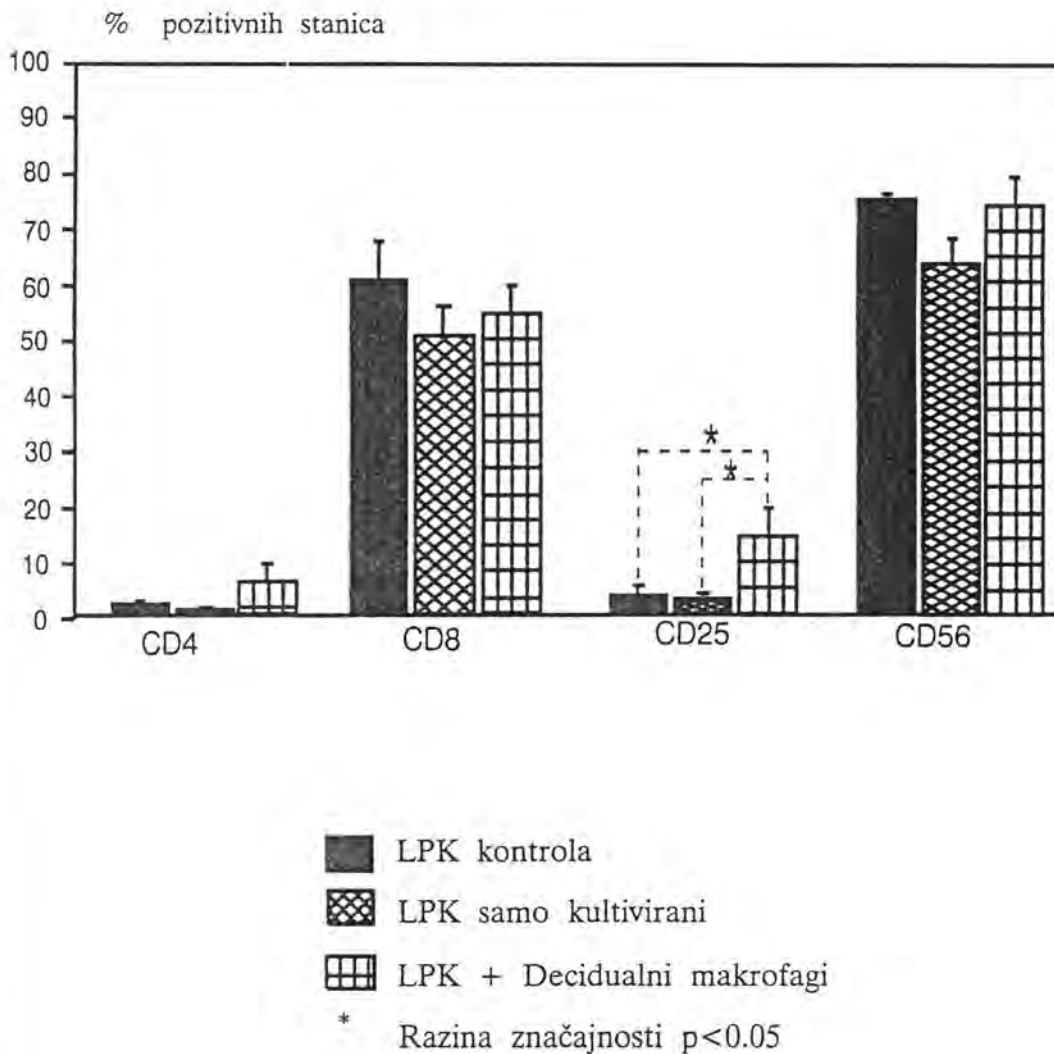
Analizirajući dvostruko pozitivne (perforin<sup>+</sup> i CD marker<sup>+</sup>) stanice periferne krvi (slika 8) uočili smo da decidualni makrofagi zakočeni mitomicinom izazivaju značajni postotni porast P<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (16,6% : 6,7%), P<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (22,0% : 12,80%) i P<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (2,0% : 4,6%) limfocita periferne krvi u odnosu na suspenziju stanica koja nije kokultivirana sa decidualnim makrofagima.

**Slika 8. Dvostruko pozitivni (P+ CD marker+) LPK negravida (n=6) nakon 18-satne kultivacije i kokultivacije sa mitomicinom zakočanim decidualnim makrofagima**



Istovremeno do značajnije promjene fenotipskih obilježja perforin pozitivnih stanica koje su bile kokultivirane sa decidualnim makrofagima u odnosu na perforin pozitivne stanice koje su kultivirane same (slika 9). Jedini statistički značajan nalaz za fenotipska obilježja perforin pozitivnih stanica, koje su kultivirane u tim uvjetima, je značajno veća ekspresija IL-2 receptora (CD25) ( 15,3% v.s. 3,1%;  $p < 0,05$ ).

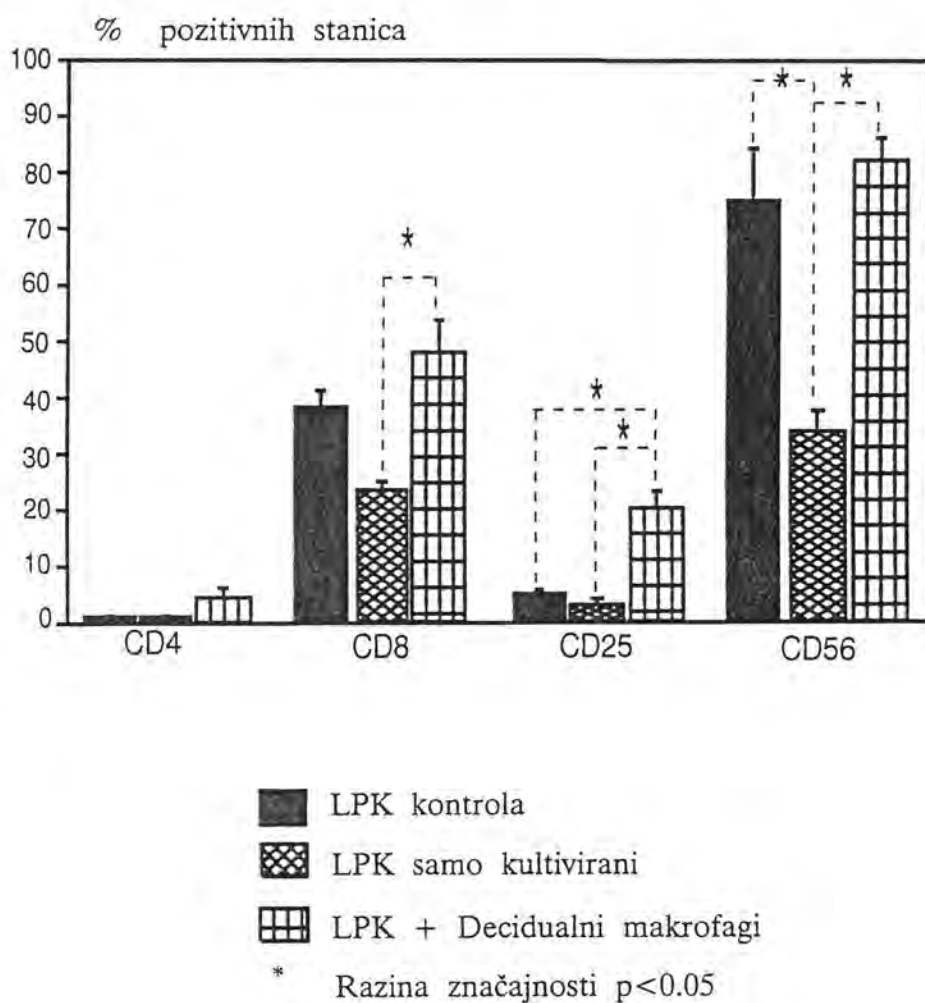
**Slika 9. Fenotipske karakteristike perforin pozitivnih LPK negravida nakon 18-satne kultivacije i kokultivacije sa mitomicinom zakočenim decidualnim makrofagima**



Ako se analiziraju pojedine stanične podvrste limfocita u suspenziji stanica koje su kultivirane sa decidualnim makrofagima, vidljivo je (slika 10) da je statistički značajno više perforin pozitivnih stanica među NK

(CD56<sup>+</sup>) limfocitima (82,2% : 34,1%; p<0.001), citotoksikčim (CD8<sup>+</sup>) limfocitima (48,7 % : 24,3%; p<0.05), te aktiviranim (CD25<sup>+</sup>) limfocitima (20.4% v.s. 4,6%; p<0.05).

**Slika 10. Zastupljenost perforin pozitivnih stanica u različitim podvrstama LPK negravidna nakon 18-satne kultivacije i kokultivacije sa mitomicinom zakočenim decidualnim makrofagima**



#### 4.5. Kokultivacija perforin pozitivni stanica s decidualnim makrofagima sprečava gubitak perforinskih molekula iz stanica koje sadrže perforin.

Analiziranjem srednjeg inteziteta fluorescencije (AFI) za perforin posredno se dobije uvid u brojčanost perforinskih molekula u stanicama. Dvostruko pozitivni limfociti (P<sup>+</sup> CD marker<sup>+</sup>) periferne krvi negravidna,

koji su 18 sati kultivirani bez dodatka alogeničkih decidualnih makrofaga, pokazuju značajan pad količine perforina (niska vrijednost AFI) (Tablica 2). Tako AFI za perforin pada na gotovo polovične vrijednosti u P<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (30,6 ± 4,7 : 18,6 ± 1,5), te P<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (30,3 ± 4,3 : 17,6 ± 1,1). Kokultivacija istih staničnih podvrsta sa alogeničkim makrofagima uspješno blokira uočeni gubitak perforinskih molekula kako u citotoksičim limfocita (P<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), tako i u NK stanicama (P<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) periferne krvi (Tablica 2).

**Tablica 2. Srednji intenzitet fluorescencije (AFI) za perforin u dvostruko pozitivnim LPK nakon 18-satne kultivacije i kokultivacije s mitomicinom zakočenim decidualnim makrofagima.**

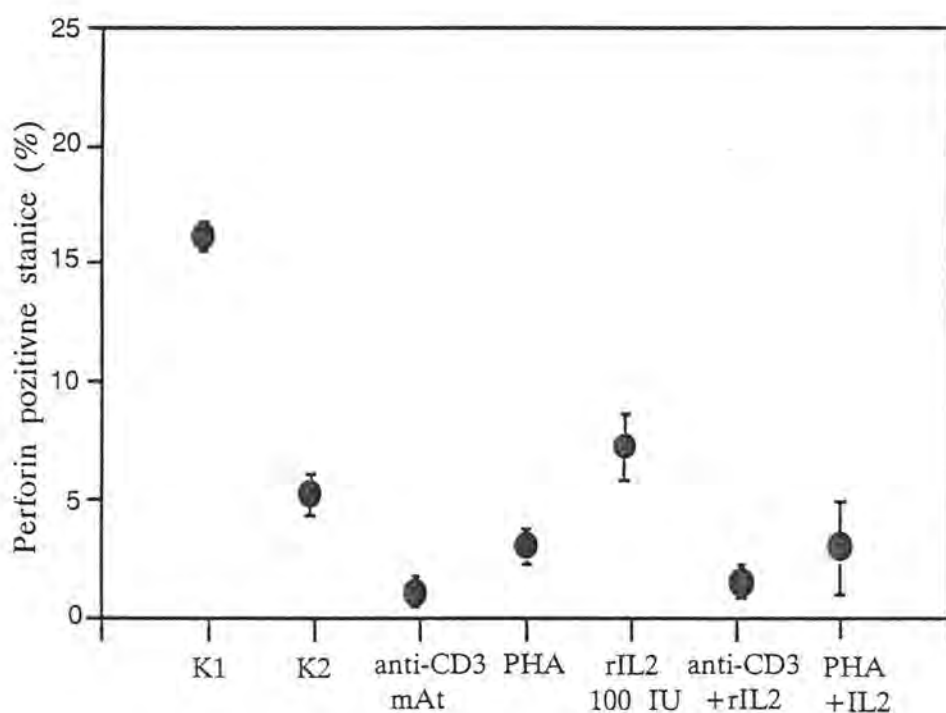
	Bez kultivacije*	18-satna kultivacija*	Kultivacija + Dec. makrofagi*
P+CD4+	22,4 ± 5,3	23,0 ± 8,0	23,9 ± 5,5
P+CD8+	30,6 ± 4,7	18,6 ± 1,5	29,5 ± 6,0
P+CD25+	32,4 ± 3,8	22,7 ± 3,5	32,9 ± 4,8
P+CD56+	30,3 ± 4,3	17,6 ± 1,1	28,1 ± 5,2

\* Srednja vrijednost ± standardna pogreška

**4.6 Stimulacija perforin pozitivnih limfocita periferne krvi prvog tromjesečja normalne trudnoće (anti-CD3 mAt, PHA, rIL-2 te kombinacijim istih) ne blokira gubitak perforina u 18 satnoj kulturi.**

Opisani fenomen gubitka perforina u perforin pozitivnim limfocitima periferne krvi nakon 18 satne kultivacije našli smo u limfocitima negravidna. U nastavku smo isti fenomen istraživali na limfocitima periferne krvi trudnica prvog tromjesečja normalne trudnoće. 18 satna kultivacija dramatično obara postotak perforin pozitivnih limfocita i u perifernoj krvi prvog tromjesečja trudnoće (16,0% v.s. 5,3%;  $p < 0.01$ ). Gubitak perforina u limfocitima periferne krvi prvog tromjesečja trudnoće nismo uspjeli spriječiti niti stimulacijom sa anti-CD3 mAt, PHA, rIL-2, te kombinacijom anti-CD3 mAt + rIL-2 i PHA + rIL-2 (slika11).

**Slika 11. Nazočnost perforina (% pozitivnih stanica) u LPK prvog tromjesječja trudnoće nakon 18-satne stimulacije s anti-CD3 mAt, PHA, rIL-2, te kombinacijom istih**

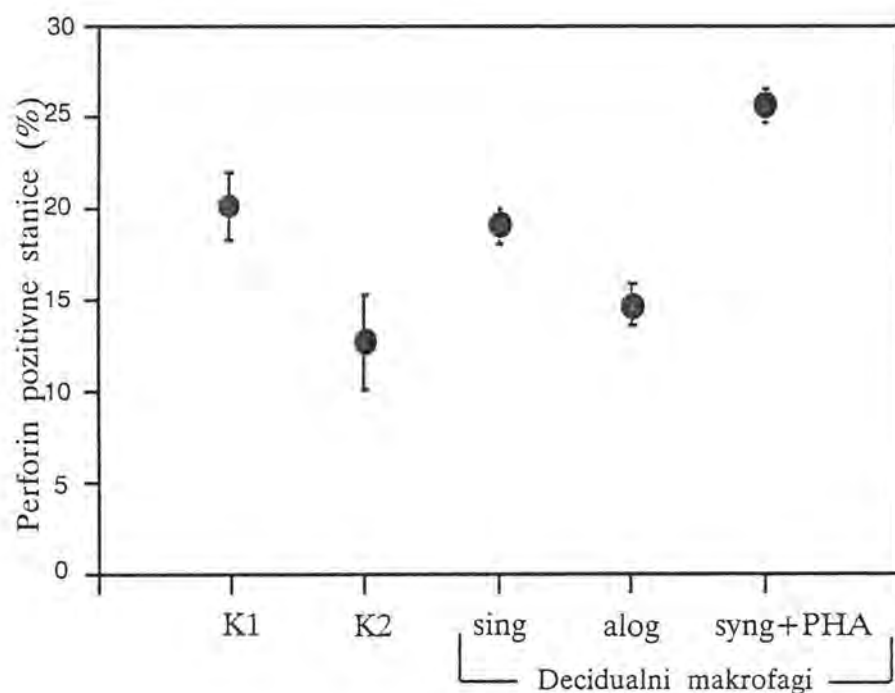


K1 = kontrola (0-to vrijeme)      K2 = samo kultivacija (18 sati)

#### 4.7 Decidualni makrofagi sprečavaju gubitak perforina iz limfocita periferne krvi prvog tromjesečja trudnoće.

Koristili smo isti protokol za blokiranje gubitka perforina što smo ga opisali u pokusima sa limfocitima negravidna. Istarživali smo funkcijske karakteristike singeničkih i alogeničkih decidualnih makrofaga koje smo kultivirali s LPK prvog tromjesječja trudnoće (slika 12). Kao što slika 12 pokazuje singenički decidualni makrofagi u potpunosti održavaju perforin pozitivne limfocite prvog tromjesečja trudnoće u 18 satnoj kulturi, dok alogenički decidualni makrofagi u tome uspijevaju samo djelomično (slika 12).

**Slika 12. Nazočnost perforina u LPK prvog tromjesječja trudnoće nakon 18-satne kultivacije sa singeničkim ili alogeničkim decidualnim makrofagima**



K1= kontrola (0-to vrijeme)      K2= samo kultivacija (18 sati)



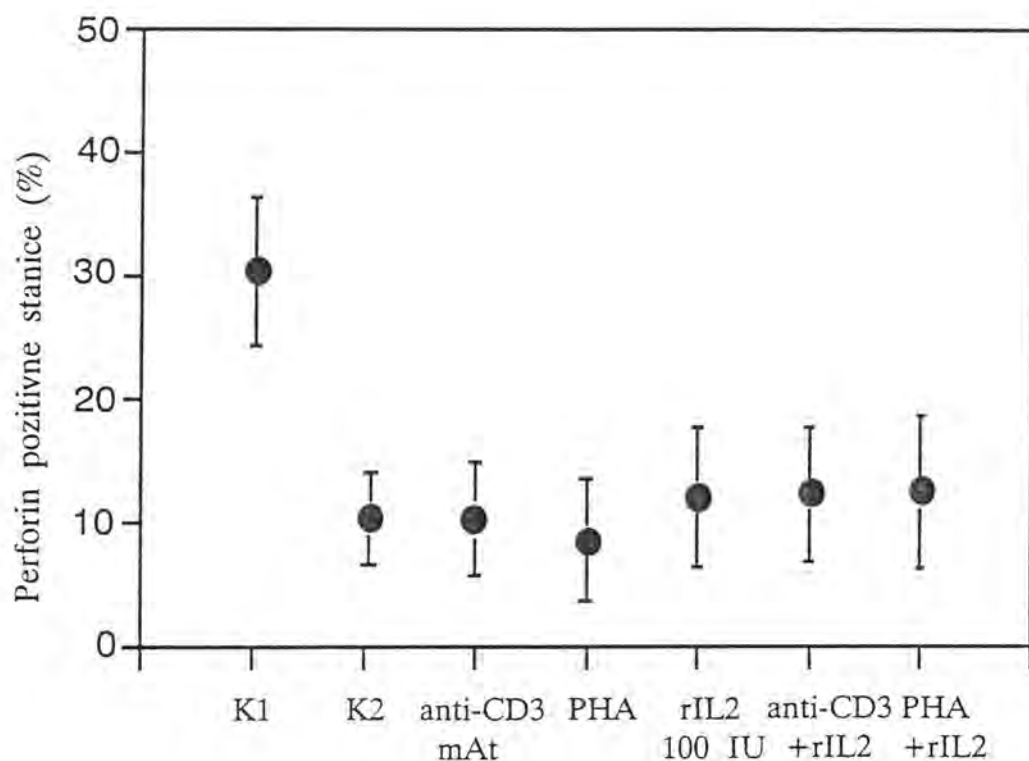
#### **4.8 Singenički decidualni makrofagi uz stimulaciju s PHA induciraju porast postotka perforin pozitivnih limfocita periferne krvi prvog tromjesečja trudnoće.**

Vodeći se pretpostavkom da je stimulacija ekspresije perforina vjerojatno uvjetovana s više signalnih puteva uz singeničke decidualne makrofage koji su se pokazali uspješni u sprečavanju gubitka perforina, suspenziju LPK istovremeno smo stimulirali s PHA, pošto većina perforin pozitivnih stanica ispoljava CD2 molekulu na svojoj površini. Nakon 18-satne kokultivacije i stimulacije došlo je do statistički značajno većeg porasta postotka perforin pozitivnih stanica u kulturi LPK trudnica prvog tromjesečja trudnoće, u odnosu na bazične vrijednosti (0-to vrijeme) (27,3% v.s. 21,1%) (slika 12).

#### **4.9 Decidualni perforin pozitivni limfociti u uvjetima 18-satne kultivacije dramatično nestaju**

Slično LPK prvog tromjesečja trudnoće i perforin pozitivni DL istih trudnica gube perforin kultivacijom kroz 18 sati. Kao što pokazuje slika (slika 13) visoka postotna zastupljenost (32,1%) perforin pozitivnih limfocita decidue dramatično opada (11,1%) nakon 18 satne kultivacije. Ovaj pad nismo uspjeli spriječiti niti stimulacijom DL u kulturi s anti-CD3 monoklonskim protutijelom (mAt), PHA, rIL-2, te kombinacijom anti-CD3 monoklonskog protutijela + rIL-2 i PHA + rIL-2 (slika 13).

Slika 13. Nazočnost perforina u DL prvog tromjesječja trudnoće nakon 18-satne kultivacije i stimulacije s anti-CD3 mAt, PHA, rIL-2, te kombinacijom istih



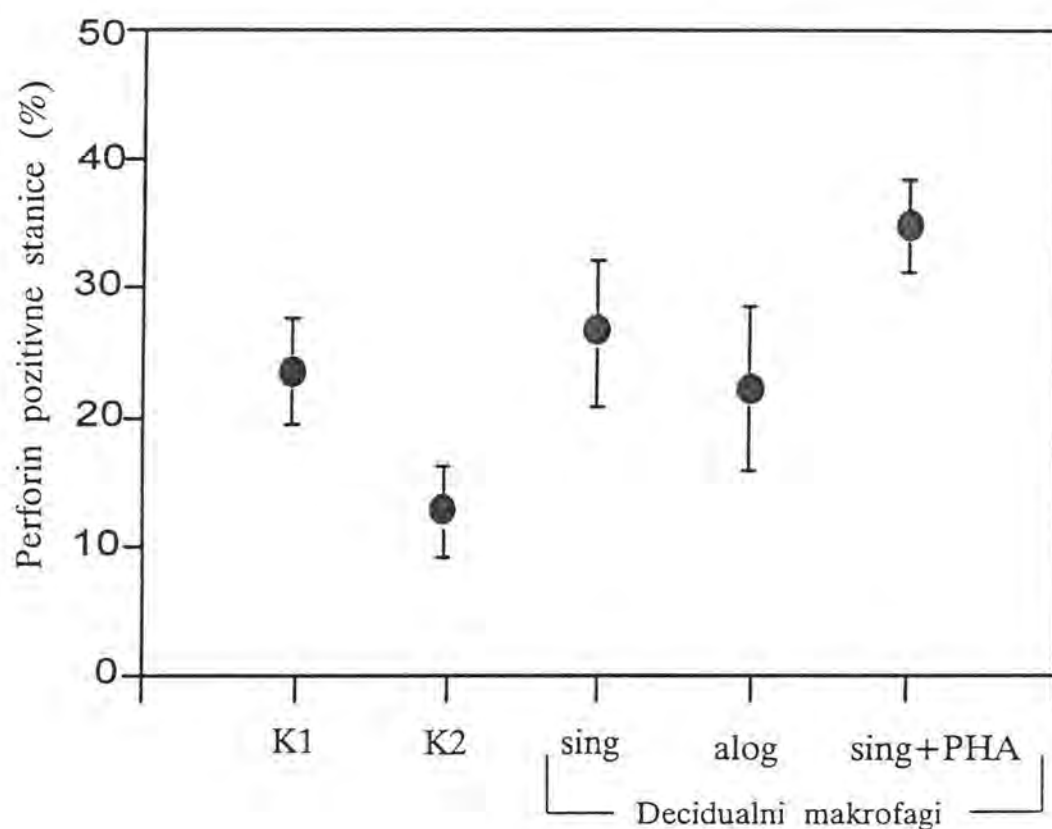
K1= kontrola (0-to vrijeme)    K2= samo kultivacija (18 sati)

#### 4.10 Singenički decidualni makrofagi sprečavaju gubitak perforina iz decidualnih limfocita u 18 satnoj kulturi.

Opaženi fenomen blokiranja nestajanja perforin pozitivnih stanica ako se LPK istovremeno kultiviraju s decidualnim makrofagima, potvrđen je i u pokusima kultiviranja DL prvog tromjesečja trudnoće. Naime, kao što pokazuje slika (slika 14) singenički, kao i alogenički, decidualni makrofagi uspješno sprečavaju nestajanje perforina iz DL tijekom 18-satne kulture. Dodatnom stimulacijom DL s PHA, u kulturi sa singeničkim decidualnim

makrofagima, uspjeli smo inducirati značajan porast ( $p < 0.05$ ) ekspresije perforina među DL, s početne vrijednosti od 25,4% na 35,3%.

**Slika 14. Nazočnost perforina u DL nakon 18-satne kultivacije sa singeničkim ili alogeničkim decidualnim makrofagima**



K1= kontrola (0-to vrijeme)

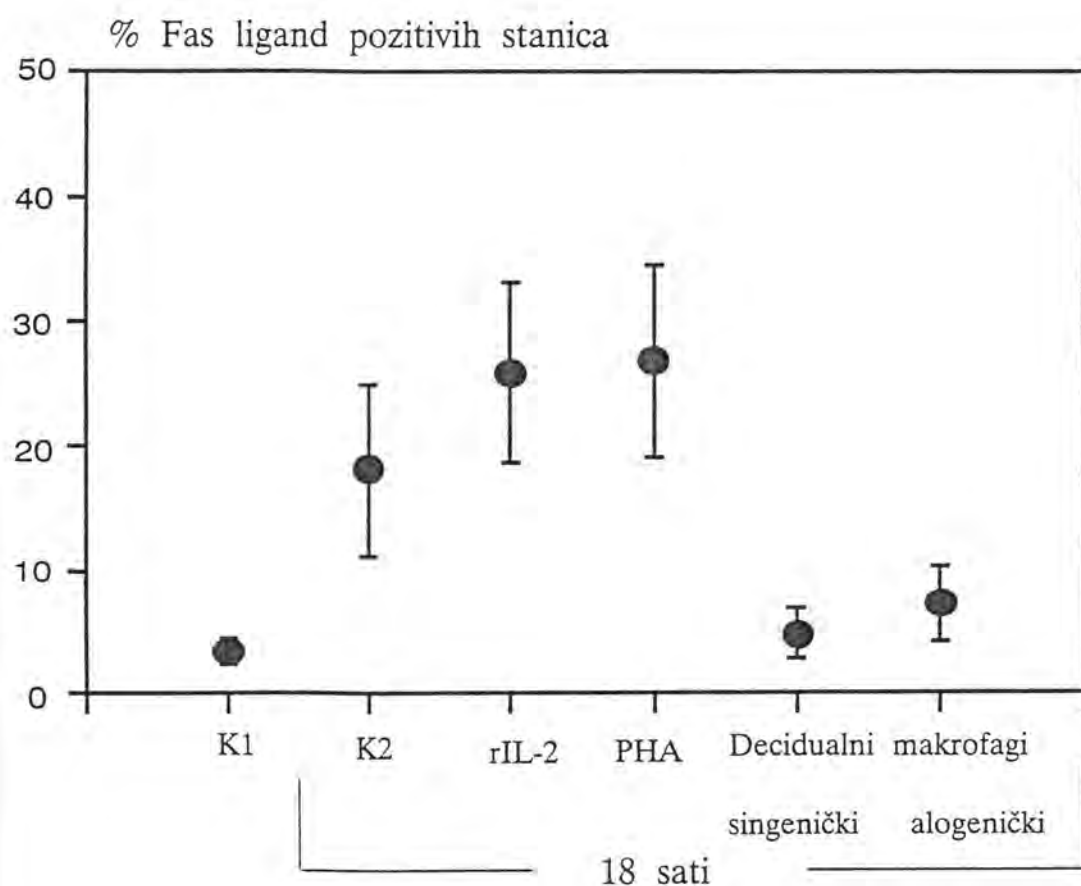
K2= samo kultivacija (18 sati)

#### 4.11 Nestajanje perforina u 18 satnoj kulturi LPK i DL praćeno je porastom ekspresije Fas liganda na površini kultiviranih stanica.

Pratili smo ispoljavanje Fas liganda, kao jedne od apoptotičkih molekula, na površini limfocita periferne krvi i decidue u uvjetima 18 satne kultivacije same ili stimulacije s PHA i rIL-2 uz prisustvo decidualnih makrofaga singeničkih ili alogeničkih. Predhodno opisani pad postotka perforin pozitivnih stanica u 18-satnoj kulturi prati porast ispoljavanja Fas

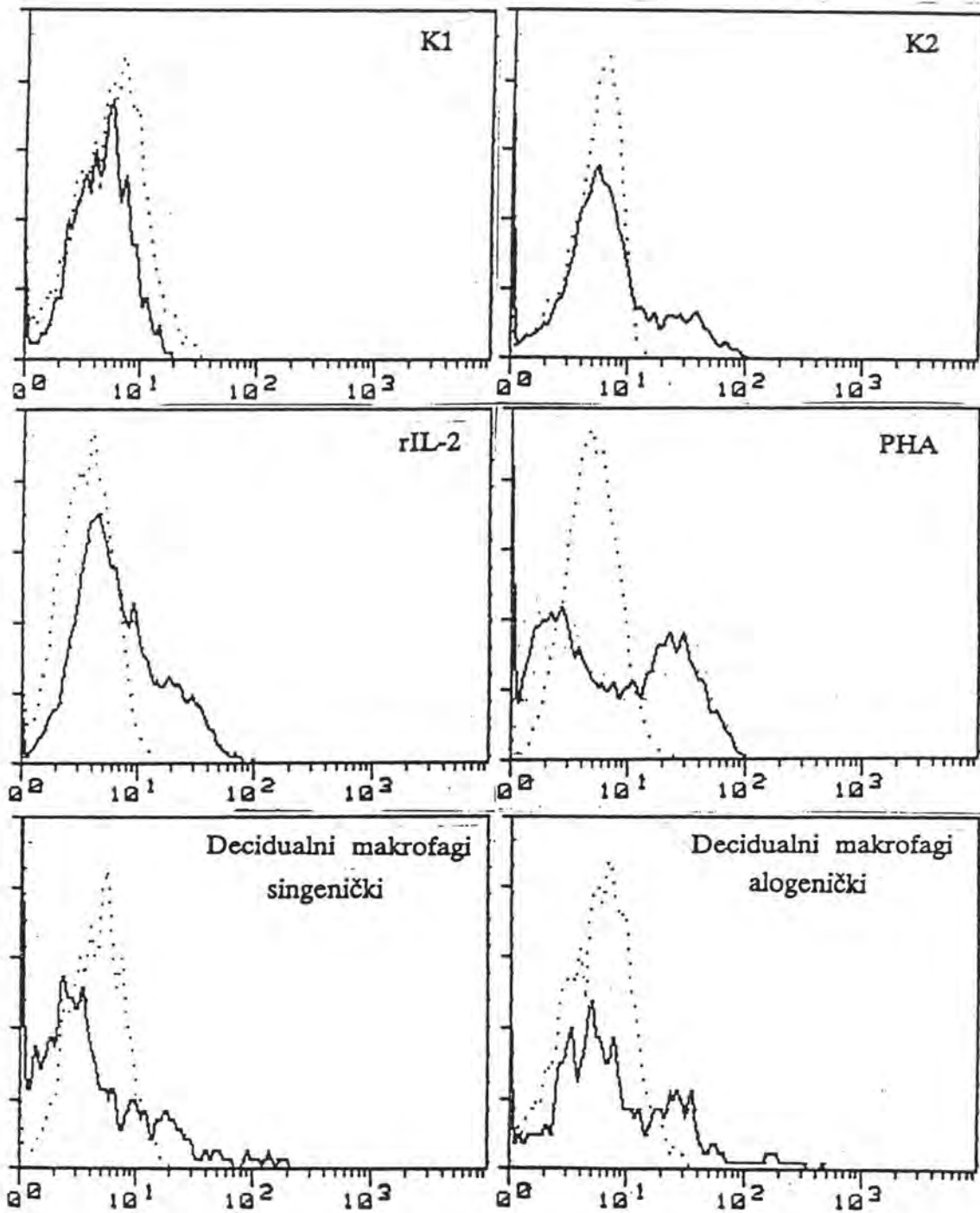
ligand pozitivnih stanica (slike 15 i 15a). Kokultivacija limfocita periferne krvi ili decidue s decidualnim makrofagima (singeničkim ili alogeničkim) sprečava nestajanje perforin pozitivnih stanica u 18-satnoj kulturi, kako je već opisano, a istovremeno se ekspresija Fas ligand pozitivnih stanica vraća na početne (0-to vrijeme) vrijednosti (slike 15 i 15a).

**Slika 15. Postotna zastupljenost Fas ligand pozitivnih DL nakon 18-satne kultivacije sa singeničkim ili alogeničkim decidualnim makrofagima, te stimulacije s rIL-2 i PHA**



K1= kontrola (0-to vrijeme) K2= samo kultivacija (18 sati)

Slika 15a. Analiziranje protočnim citometrom postotne zastupljenosti Fas-ligand pozitivnih decidualnih limfocita nakon 18-satne kultivacije sa singeničkim ili alogeničkim decidualnim makrofagima, te stimulacije sa rIL-2 i PHA



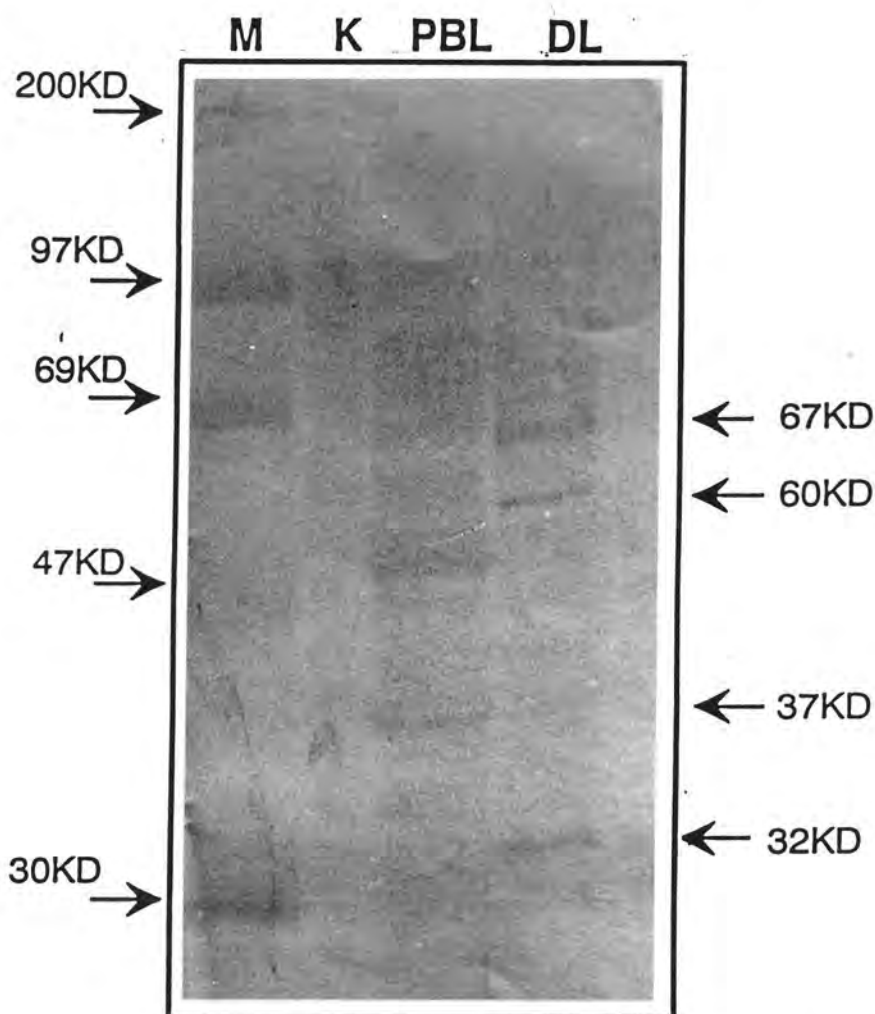
Intenzitet fluorescencije - FITC (Fas-ligand)

..... kontrolno mAt; \_\_\_\_\_ anti Fas-ligand mAt

#### 4.12 TJ6m protein prisutan je na površini limfocita periferne krvi i decidue prvog tromjesečja trudnoće

Western blot analiza pokazala je prisustvo TJ6m proteina u staničnom lizatu LPK i DL prvog tromjesečja trudnoće (slika 16). Kao što je vidljivo na slici, TJ6m protein pojavljuje se u različitim molekulskim veličinama. Tako Western blot lizat decidualnih limfocita pokazuje tri benda od približno 67, 60 i 32 KD. Lizat LPK istih trudnica pokazuje također tri benda u Western blot analizi od približno 67, 50 i 37 KD.

Slika 16. Western blot analiza lizata LPK i DL



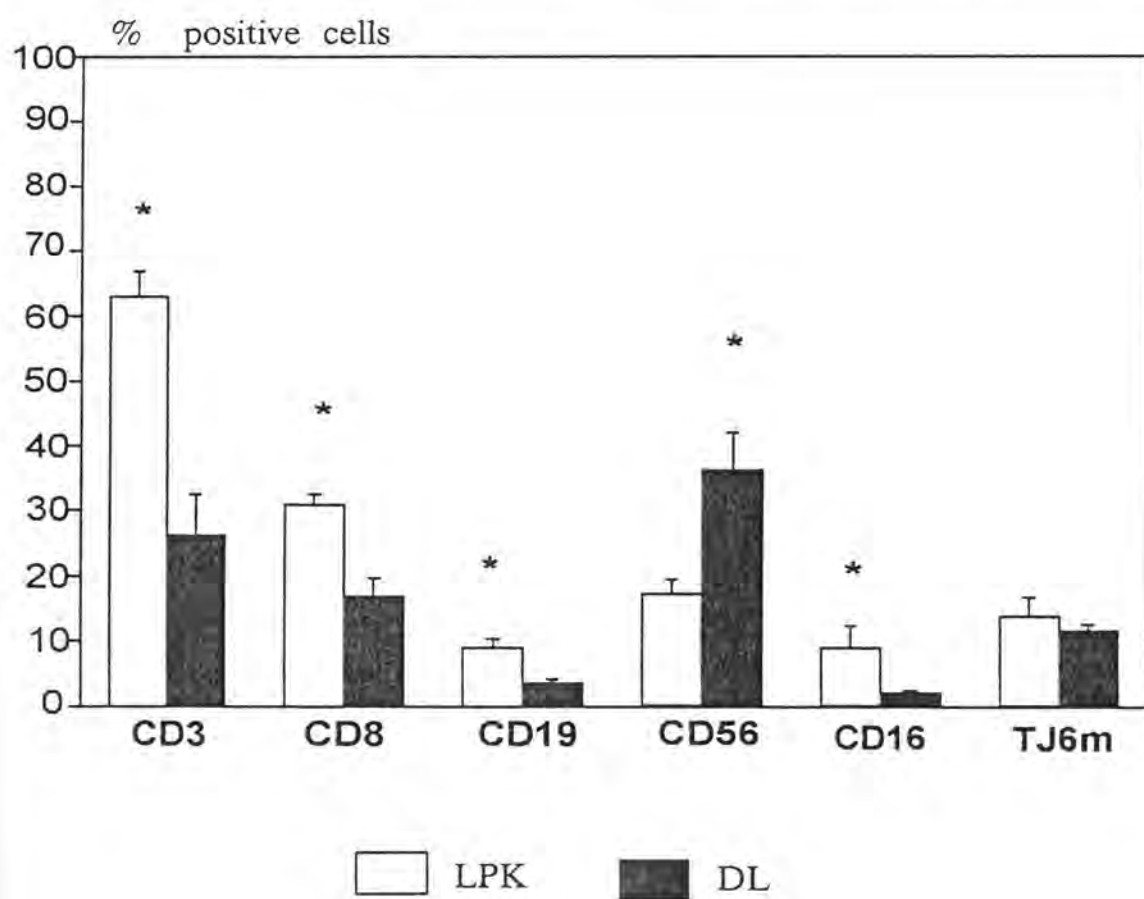
M-molekulske veličine standarda

K-negativna kontrola (Hela)

#### 4.13 TJ6m pozitivni limfociti periferne krvi i decidue prvog tromjesečja trudnoće fenotipski se razlikuju.

Zastupljenost površinskih antigena na limfocitima periferne krvi i decidualnim limfocitima određivali smo jednostrukim obilježavanjem s monoklonskim protutijelima anti CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 i CD56, te poliklonskim protutijelom anti-TJ6m, kako bi dokazali eventualne razlike u zastupljenosti površinskih antigena na lokalnom nivou (DL) i sistemskom nivou (LPK). Našli smo statistički značajne razlike između decidue i periferne krvi u zastupljenosti CD3, CD8, CD16, CD19 i CD56 antigena (slika 17). Postotak TJ6m pozitivnih stanica bio je nešto veći u LPK (16,2) nego u DL (11,4).

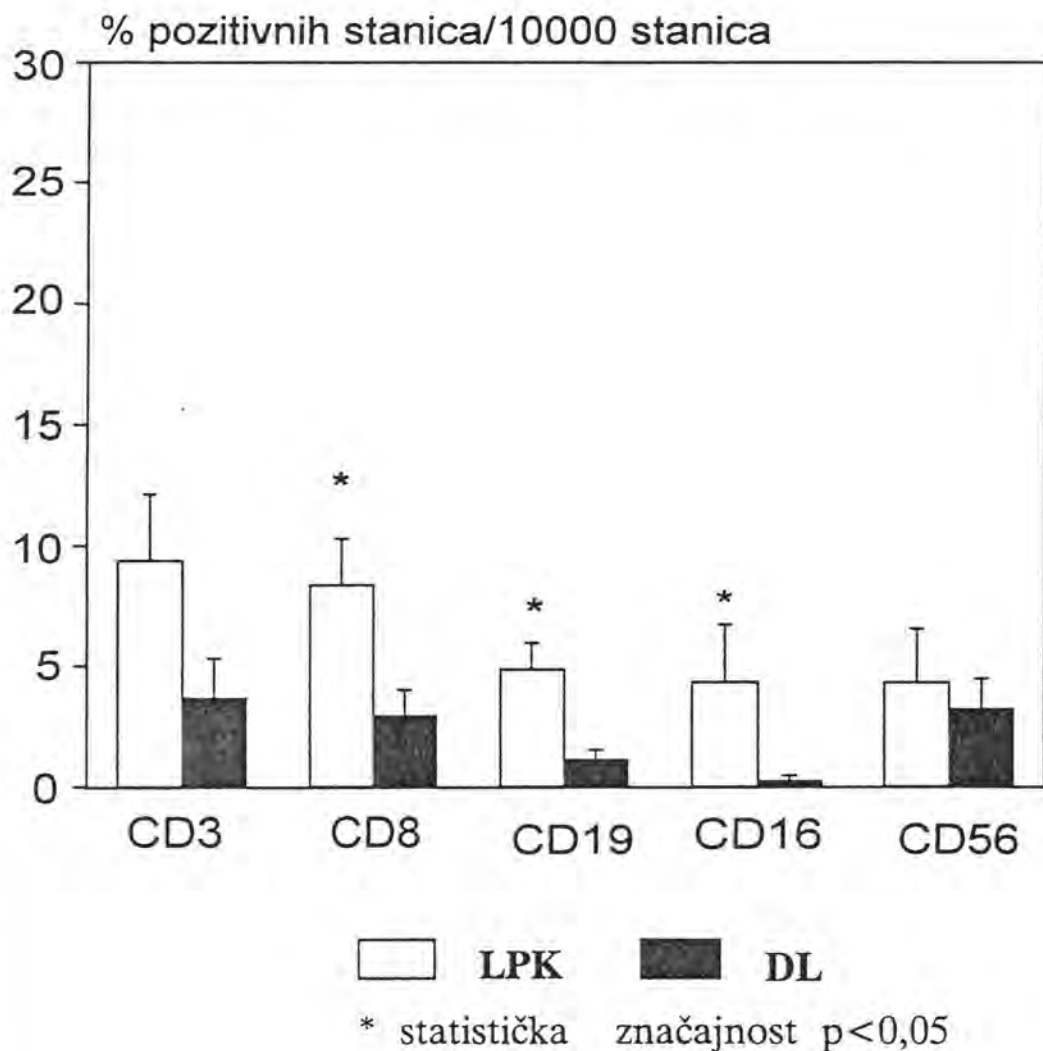
**Slika 17. Fenotipske karakteristike limfocita periferne krvi i decidue prvog trimestra normalne trudnoće (Rezultat prikazan kao  $Sx \pm SE$ )**



\* Statistička značajnost  $p < 0.05$

Ova razlika nije statistički značajna, ali su statistiki značajno niži postotci dvostruko pozitivnih decidualnih limfocita u usporedbi s LPK, 10% vs. 3% za TJ6+CD3+, 9% vs. 3% za TJ6+CD8+, 4% vs. 0,5%, za TJ6+CD16+, i 6,5% vs. 2% za TJ6+CD19+) ( $p < 0,05$ , Slika 18). Razlika nije statistički značajna za TJ6+CD56+ stanice.

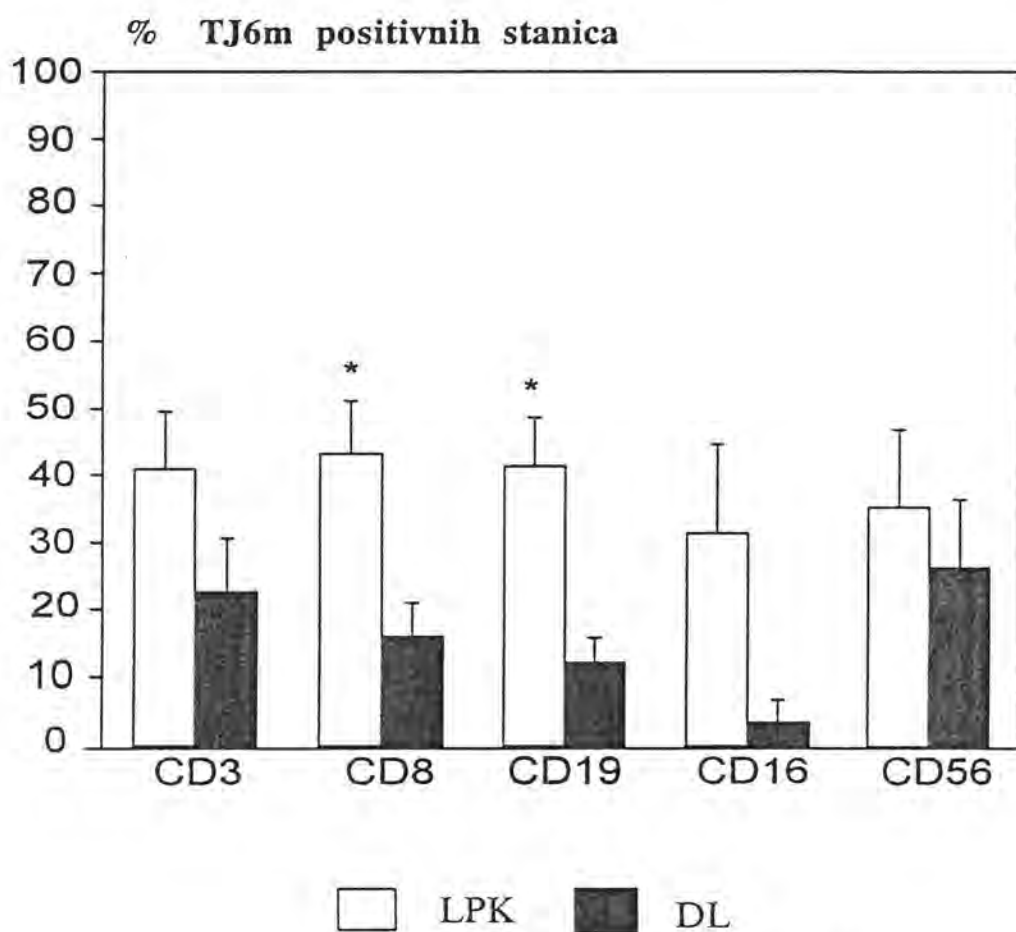
Slika 18. Dvostruko pozitivni (TJ6m+ i CD marker+) limfociti periferne krvi i decidue prvog tromjesječja trudnoće (Rezultat prikazan kao  $Sx \pm SE$ )





Na slici 19. prikazane su postotne zastupljenosti CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 i CD56 pozitivnih stanica među TJ6m pozitivnim stanicama (TJ6<sup>+</sup> stanice = 100%). Nadli smo statistički značajno viši postotak CD8<sup>+</sup> stanica u perifernoj krvi nego u decidui (43% : 16%), te CD19<sup>+</sup> stanica (42% : 13%) i CD16<sup>+</sup> stanica (32% : 3%). U perifernoj krvi viši je i postotak TJ6<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> stanica (40% : 19%), ali razlika nije značajna. Nema razlike u zastupljenosti CD56<sup>+</sup> stanica među TJ6m pozitivnim stanicama periferne krvi i decidue.

**Slika 19. Fenotipske karakteristike TJ6 pozitivnih limfocita periferne krvi i decidue prvog tromjesječja trudnoće (Rezultat prikazan kao Sx gejtiranih TJ6m pozitivnih stanica ± SE)**

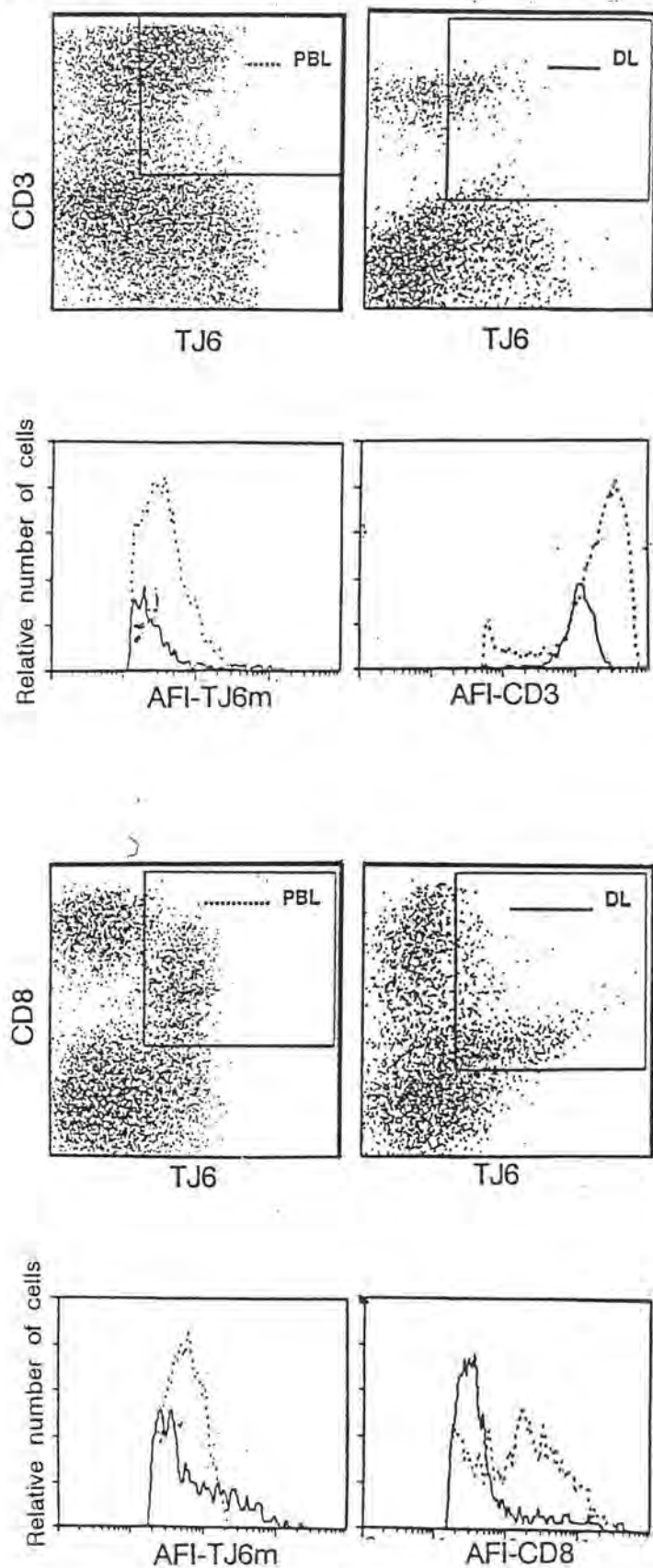


\* Statistička značajnost  $p < 0.05$

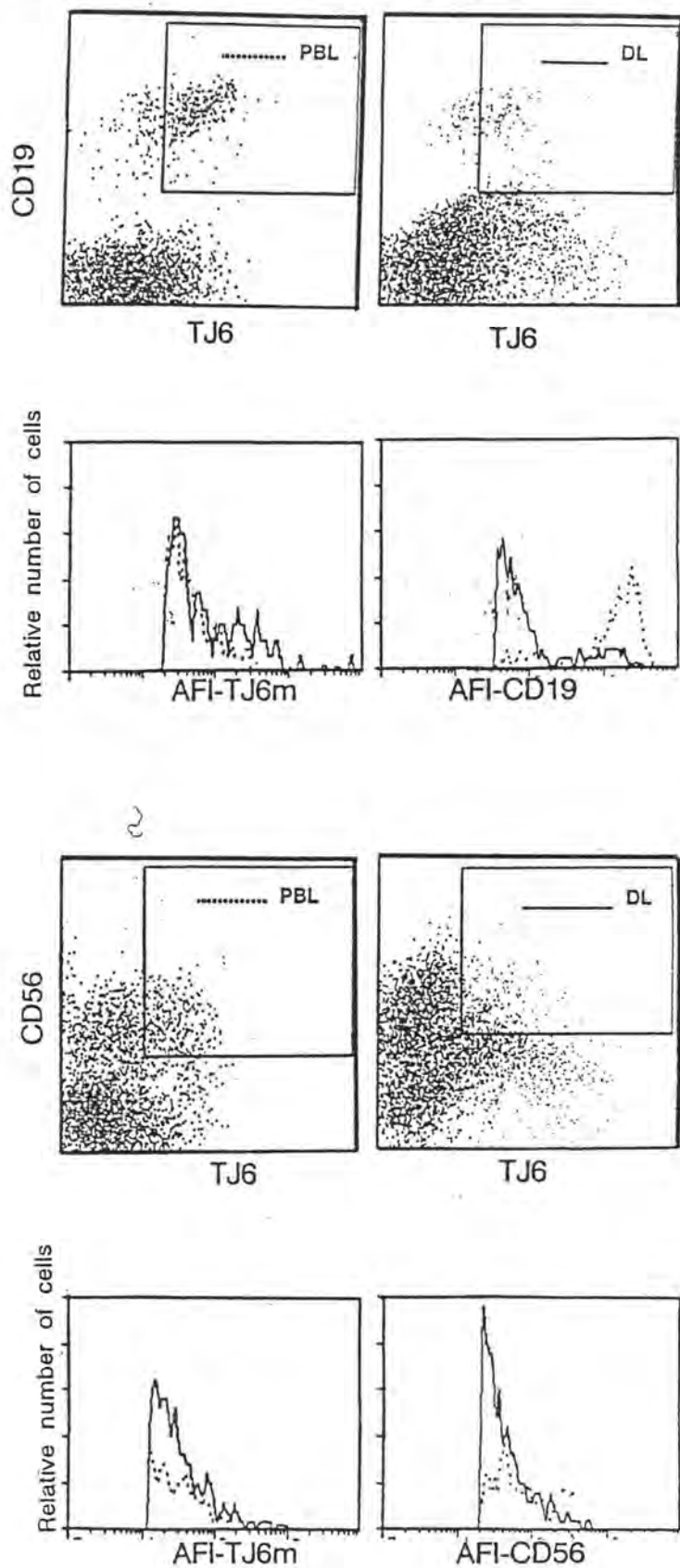
#### 4.14 CD3 monoklonsko protutijelo povećava ekspresiju TJ6 molekule na površini LPK

Nakon uobičajene polusatne procedure inkubacije stanica s monoklonskim protutijelima za površinske antigene (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 i CD56) u uzorcima gdje se istovremeno određivala i postotna zastupljenost TJ6m pozitivnih stanica uočili smo stimulacijski učinak anti-CD3 monoklonskog protutijela na ekspresiju TJ6m molekule na površini limfocita periferne krvi. Naime, postotak TJ6m<sup>+</sup> stanica u tom uzorku bio je znatno viši nego u uzorcima gdje se istovremeno obilježavala TJ6 molekula i CD4, CD8, CD16, CD19 i CD56 molekula (slika 19a i 19b). Isti tretma nije dao takve evidentne učinke na TJ6m molekule na CD3<sup>+</sup> decidualnim limfocitima (slika 19a i 19b).

Slika 19a. Srednji intenzitet fluorescencije (AFI) za TJ6m i CD molekule u dvostruko pozitivnih ( $TJ6m^+$  i  $CD\ marker^+$ ) limfocita periferne krvi i decidue prvog tromjesječja trudnoće



Slika 19b. Srednji intenzitet fluorescencije (AFI) za TJ6m i CD molekule u dvostruko pozitivnih (TJ6m<sup>+</sup> i CD marker<sup>+</sup>) limfocita periferne krvi i decidue prvog tromjesjeća trudnoće



4.15 Razlike u intenzitetu ekspresije TJ6m molekule između decidualnih limfocita i limfocita periferne krvi prvog tromjesečja trudnoće.

Tablica 3 i slika 19a i 19b. uspoređuju srednje intenzitete fluorescencije za TJ6m i površinske (CD) molekule u limfocita periferne krvi i decidualnim limfocitima. Srednji intenzitet fluorescencije određen protočnom citometrijom indirektno govori o relativnom broju molekula prisutnih na ili u stanici (Samner i sur. 1991.) Postoje značajne razlike u srednjem intenzitetu fluorescencije i za TJ6m i za CD molekule. AFI za CD molekule je viši u LPK nego u DL, osim za TJ6m<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> stanica. Od interesa je naglasiti da je gustoća TJ6m molekula na decidualnim limfocitima značajno veća nego na LPK.

Tablica 3. Srednji intenzitet fluorescencije (AFI) za perforin i CD molekule u dvostruko pozitivnih (TJ6m<sup>+</sup> i CD marker<sup>+</sup>) limfocita periferne krvi i decidue prvog tromjesječja trudnoće

Dvosruko pozitivne stanice	Uzorak	AFI ± SE (TJ6m)	AFI ± SE (CD)
1. a) TJ6m+CD3+	LPK	98 ± 33	2994 ± 183
b) TJ6m+CD3+	DL	129 ± 25	961 ± 173
2 a) TJ6m+CD8+	LPK	66 ± 7	738 ± 220
b) TJ6m+CD8+	DL	173± 29	598 ± 111
3. a) TJ6m+CD19+	LPK	94 ± 21	720 ± 158
b) TJ6m+CD19+	DL	158 ± 24	315 ± 54
4. a) TJ6m+CD56+	LPK	83 ± 22	245 ± 116
b) TJ6m+CD56+	DL	128 ± 22	350 ± 26

Razina statističke značajnosti 1. za TJ6m: 2a:2b (p<0,005); 3a:3b (p<0,05); 4a:4b (p<0,05) 2. za CD molekule: 1a:1b (p>0,001); 3a:3b (p<0,01)

U našim istraživanjima ispitivali smo i veličinu i granuliranost dvostrukopozitivnih limfocita (TJ6m+CD+) u perifernoj krvi i decidui. Vrlo je interesantan nalaz da je granuliranost dvostrukopozitivnih (TJ6m+CD+) DL veća od granuliranosti dvostruko pozitivnih LPK (tablica 4). Ovaj se zaključak odnosi na sve subpopulacije dvostrukopozitivnih stanica. Nije uočena razlika u veličini tih stanica između DL i LPK.

**Tablica 4. Srednji intenzitet fluorescencije (AFI) za granuliranost dvostruko pozitivnih (TJ6m+ i CD marker+) limfocita periferne krvi i decidue prvog tromjesječja trudnoće**

Dvostruko pozitivne stanice	Uzorak	AFI +/- SE	p*
1. TJ6m+CD3+	LPK	37,8 ± 9,7	0,05
	DL	67,5 ± 16,8	
2. TJ6m+CD8+	LPK	28,6 ± 3,6	0,01
	DL	71,4 ± 16,8	
3. TJ6m+CD19+	LPK	32,2 ± 7,9	0,05
	DL	83,7 ± 26,0	
4. TJ6m+CD56+	LPK	33,2 ± 4,2	0,01
	DL	100,9 ± 29,8	

\*Razina značajnosti za DL vs LPK

## 5 DISKUSIJA

Imunoregulacijski mehanizmi prisutni na mjestu dodira majčinih i fetalnih tkiva, za koje se pretpostavlja da sprečavaju odbacivanje fetusa kao alotransplantata, predmet su mnogobrojnih istraživanja. Morfološka podloga imunoloških reakcija koje sudjeluju u održavanju fetusa tijekom trudnoće od izuzetne je važnosti. Stoga nije čudno da su brojni radovi koji govore o sastavu i karakteristikama stanica koje posreduju te reakcije, a i ovaj rad je jedan od tih.

U zadnje vrijeme najintezivnije se radilo na otkrivanju fenotipskih karakteristika stanica u decidui tijekom normalne trudnoće, u želji da se odgovori na pitanje koje su stanice odgovorne za toleriranje fetusa kao alotransplantata u imunokompetentnom organizmu majke.

Do danas su otkrivene i opisane brojne podvrste stanica u decidui. Među najbrojnije stanice ubrajaju se makrofagi (81) kojima se pripisuje uloga fagocitoze i prezentiranja antigena (192), a vjerojatno sudjeluje i u imunoregulacijskim mehanizmima. Najbrojniju podvrstu čine veliki granulirani limfociti (LGL), koji su danas glavni predmet istraživanja. Gotovo svi (90%) potječu iz koštane srži, a fenotipskih su obilježja  $CD2^+CD3^-CD56^+Perforin^+$  (203). Treću podvrstu u decidui čini mala populacija zrelih  $CD3^+$  limfocita (21).

Prema tome u blizini fetoplacentne jedinice mogu se naći citolitički limfociti koji sudjeluju u antigen specifičnom MHC-posredovanom ubijanju i antigen nespecifičnom MHC-nerestriktivnom ubijanju. Poznato je da stanice sa citolitičkom aktivnošću (citotoksički limfociti T, NK stanice, gama/delta  $TCR^+T$  stanice i LAK stanice) u svojoj citoplazmi sadže perforin. Perforin je jedan od intracelularnih citolitičkih proteina koji posreduju u lizi ciljnih stanica i može biti marker za otkrivanje funkcionalne aktivnosti citolitičkih limfocita *in vivo* (108).

Ekspresija perforina u nestimuliranih humanih LPK studirana je kao razina mRNA za perforin i kao razina ekspresije perforin proteina.

Istraživanja ekspresije perforina u našem laboratoriju na različitim kliničkim modelima kao što je alotransplantacija (bubrega) i autoimunost (multipla skleroza) pokazala su da bi ekspresija perforina mogla biti biljeg aktiviranih citolitičkih limfocita *in vivo*. U primatelja bubrežnih alotransplantata porast razine perforina predhodi pojavi kliničkih znakova krize odbacivanja, što sugerira da bi citotoksičnost posredovana perforinom mogla biti važan mehanizam u odbacivanju alotransplantata (202).

Kako je već predhodno objašnjeno fetoplacentna jedinica u sisavaca definirana je kao semialogenski transplantat, pa je logično za očekivati određene promjene u ekspresiji perforina slične onima u alotransplantaciji, ali imajući na umu bitnu razliku između trudnoće i alotransplantacije organa. Naime, u alotransplantaciji imunološki odgovor primatelja je snažno suprimiran djelovanjem imunosupresivne terapije, dok je imunološki odgovor u trudnoći moduliran, a ne imunosuprimiran. Nalaz porasta perforin pozitivnih LPK na terminu poroda mogao bi se usporediti s porastom perforin pozitivnih LPK u akutnoj reakciji odbacivanja bubrežnog transplantata. Tako kao što je porast perforina značajan signal za akutnu reakciju odbacivanja bubrežnog transplantata (202), može biti i jedan od signala za početak poroda.

Poznato je da podvrste citolitičkih stanica, i CTL i NK stanice, mogu igrati specifičnu ulogu u različitim fiziološkim i patofiziološkim uvjetima. Perforin je prisutan i u CTL i u NK stanicama. Tako detekcija perforina u limfocitnim podvrstama može dati značajne podatke o eventualnoj patogenetskoj ulozi perforina u različitim kliničkim entitetima.

U ovom radu smo pokazali da je ukupni postotak P<sup>+</sup> stanica rubno niži u krvi tijekom prvog tromjesječja trudnoće, a značajno viši u krvi terminske trudnoće, ako ih kompariramo s krvi negravidna. Nadalje, udio perforin pozitivnih stanica značajno raste u limfocitima T (CD3<sup>+</sup>P<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup>), kako u prvom tromjesječju trudnoće tako i na terminu poroda. Isti porast bilježi se i za CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanice. Ipak, najuočljivije su promjene u CD16<sup>+</sup> podvrsti tijekom prvog tromjesječja trudnoće u odnosu



na krv negravide i krv na termin poroda. Naime, vidljiv je dramatičan pad  $CD16^+P^+$  stanica,  $CD16^+$  stanica među  $P^+$  stanicama, te  $P^+$  stanica među  $CD16^+$  stanicama. Treba uočiti i porast  $CD4^+$  stanica među  $P^+$  stanicama tijekom prvog tromjesječja trudnoće. Srednji intenzitet fluorescencije za perforin značajno je niži za  $P^+$  stanice u prvom tromjesječju trudnoće u odnosu na  $P^+$  stanice negravide i na terminu poroda.

U općem dijelu smo pokazali da stanice porijeklom iz koštane srži infiltriraju humani endometrij i deciduu. Te stanice su uglavnom veliki granulirani limfociti, koji pripadaju neklasičnim NK stanicama, a nose fenotipska obilježja  $CD56^{bright}CD16^-$  (106). U predhodnim radovima smo dokazali da su te stanice pune perforina, te da 98% od decidualnih NK stanica nose obilježja  $CD56^{bright}CD16^-P^{bright}$  (203). U perifernoj krvi zdravih osoba većina cirkulirajućih NK stanica (oko 90%) su  $CD56^{dim}CD16^{bright}$  a samo 10% ih ima obilježja decidualnih stanica ( $CD56^{bright}CD16^{-/dim}$ ) (106). U ovom radu pokazali smo da u prvom tromjesječju trudnoće među cirkulirajućim NK stanicama dominira podvrsta koja nosi obilježja decidualnih stanica, tj. ove stanice su  $CD56^{bright}CD16^{-/dim}$ , a ujedno su i  $P^{dim}$ . Na kraju trudnoće, na sam termin poroda, cirkulirajuće NK stanice su istih fenotipskih obilježja kao i u krvi negravida. Ovaj nalaz daje potvrdu mišljenju da podvrsta agranuliranih  $CD56^{bright}CD16^-$  stanica u krvi pripada stanicama koje migriraju iz koštane srži u uterus, kao jedno od ekstratimičnih mjesta za njihovo daljnje diferenciranje (106). Prema tome rezultati prikazani u ovom radu, kao što je porast decidualnog fenotipa NK stanica u krvi tijekom prvog tromjesječja trudnoće, kao i predhodni nalazi o istovremenom porastu tih stanica u decidui (203), podržavaju citirane hipoteze.

U prvom tromjesječju trudnoće  $CD16^+P^+$  stanice su jedina stanična podvrsta  $P^+$  stanica koja postotno pada, dok su sve ostale stanične podvrste  $P^+$  stanica u porastu. Postotak  $CD16^+P^+$  je svega 2% u LPK prvog tromjesječja trudnoće (12% u negravida), a postotak  $CD56^+P^+$  stanica je 16% (statistički značajno više u usporedbi sa negravidama), što

ističe da samo dio od CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica može ujedno biti CD16<sup>+</sup>. Ovi rezultati su slični rezultatima Kwak i suradnika (116), koji su pronašli statistički značajno niži nivo CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> stanica u prvom tromjesječju trudnoće, ali statistički značajno viši nivo u trudnica koje u anamnezi imaju rekurentne spontane abortuse, ako ih usporedimo s normalnom zdravom kontrolom. Snažna down-regulacija CD16<sup>+</sup>P<sup>+</sup> u perifernoj krvi prvog tromjesječja trudnoće odgovara našim rezultatima, predhodno objavljenim, za deciduu prvog tromjesječja trudnoće (203).

FcgRIII (CD16) je receptor niskog afiniteta koji se javlja u dva oblika, jedan (FcgRIIIA) je protein molekulske mase 45.000-65.000 i izražava se na NK stanicama i makrofagima kao transmembranski protein (191). CD16 molekula je jedina molekula koja je odgovorna za citotoksičnost ovisnu o protutijelima (1), a koja bi mogla biti značajna u nekim tipovima reakcije na alogenski presadak. Rana faza trudnoće bi mogla biti razdoblje kada fetoplacentnu jedinicu, kao semialogenski presadak, treba zaštititi od citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADDC), što je kombinacija prirodne i adaptivne imunosti. Ta zaštita (down-regulacija CD16<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica) je prisutna i na lokalnom nivou (u decidui) i na sistemskom nivou (perifernoj krvi). FcgRIIIA molekulu može se naći i na trofoblastnim stanicama (249). Interesantno je da je izražavanje FcgRIIIA visoko tijekom prvog tromjesječja trudnoće, ali ne na terminu poroda.

Uloga perforina u ranim fazama trudnoće je također proučavana u našim istraživanjima. Značajan porast perforin<sup>+</sup> stanica na terminu poroda (40% P<sup>+</sup> LPK u usporedbi sa 25% P<sup>+</sup> LPK tijekom prvog tromjesječja trudnoće) uvjetovan je istovremenim porastom P<sup>+</sup> T stanica i NK stanica. Zanimljivo je da postotak CD16<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica (23%) je vrlo blizak postotku CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica (28%). Porast dvostruko pozitivnih T stanica (CD3<sup>+</sup>P<sup>+</sup>) u krvi tijekom prvog tromjesječja trudnoće i trudnoće na terminu, s paralelnim porastom obiju podvrsta (CD4<sup>+</sup>P<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup>) naglašava njihovu protektivnu ulogu u trudnoći. Bilo je poznato da je broj CD3<sup>+</sup> stanica

značajno smanjen u trudnoći s ponavljajućim spontanim abortusima (D17). Mi smo također našli pad postotka P<sup>+</sup> CTL u LPK pacijentica s missed abortusima (75).

U našem slučaju porast CD4<sup>+</sup> stanica među P<sup>+</sup> stanicama u prvom tromjesjeću trudnoće ( od 6% na 18%) naglašava potencijalnu ulogu CTL s MHC klas II restriktivnim potencijalom.

Najnovija istraživanja s P deficitnim, Fas ligand deficitnim i dvostruko deficitnim miševima bacila su novo svjetlo na moguće uloge citolitičkih mehanizma i perforina u kontroli imunog odgovora. Ta istraživanja su pokazala da P nije neophodan za normalnu reprodukciju, jer se i perforin deficitni miševi dobro razmnožavaju (98,228). To se objašnjava djelovanjem kompenzacijskih mehanizama koji posreduju u citolitičkim reakcijama, kao što je npr. FasL-Fas. Međutim, ženke dvostruko deficitnih miševa (FasL i perforin) razvijaju snažnu infiltraciju stanicama monocitno-makrofagnog reda, adherentne stanice u genitalnom traktu i nisu sposobne za reprodukciju (226).

Po našem mišljenju, a na temelju brojnih istraživanja, glavna uloga P-posredovane citolize mogla bi biti u eliminaciji infekcije virusima i intracelularnim parazitima i eliminaciji tumorskih stanica. U ženskom genitalnom traktu stanice koje sadrže perforin mogu sudjelovati u imunom nadzoru i odstranjivanju staničnog debrisa. Rezultati dobiveni u dvostruko deficitnih miševa pokazali su i novu važnu funkciju perforina u kontroli adherentnih stanica, kao što je uloga perforina u zaustavljanju limfoproliferacije i to putem kontrole antigenske prezentacije. Sluznice genitalnog trakta bogato su infiltrirane upravo ovim tipom stanica, što naglašava ulogu perforina u kontroli proliferacije limfocita koji fiziološki infiltriraju ženski genitalni trakt.

Istraživanja mehanizama perforinom posredovane citotoksičnosti od velikog su interesa, ali su otežana problemom dugotrajnije kultivacije perforin pozitivnih stanica. Pošto humana decidua obiluje perforin<sup>+</sup> stanicama, naime 42% od svih decidualnih limfocita u svojoj citoplazmi

sadrži perforin (203), istražili smo mehanizme odgovorne za opstajanje perforin pozitivnih stanica u kulturi decidualnih limfocita. U našim rezultatima smo pokazali da 18-satna kultivacija perforin pozitivnih LPK negravidna, gravida, kao i decidualnih limfocita, uvjetuje dramatičan opad perforin<sup>+</sup> stanica, te da ujedno oada i AFI za perforin. Što to uvjetuje nestajanje perforina iz perforin pozitivnih stanica tijekom 18-satne kultivacije nije razjašnjeno. Možemo samo nagađati da možda perforin pozitivne stanice u kulturi LPK negravidna, gravida i DL, slično perforin pozitivnoj staničnoj liniji YT imaju tendenciju spontane degranulacije. Naime, perforin pozitivna stanična linija YT spontano degranulira ako broj stanica nadmaši 1 mil./ml stanične suspenzije. Iako smo vodili računa o tom fenomenu, i u svim našim pokusima podesili broj stanica na 1 mil/ml, perforin je dramatično nestajao iz njih dok se broj stanica nije mijenjao tijekom 18-satne kultivacije. To ukazuje da se radi o degranulaciji perforin pozitivnih stanica. Degranulacija perforin pozitivnih stanica i perforin pozitivne stanične linije YT videna je obično tijekom litičkih mehanizama koji su posredovani tim stanicama. Tako su opisana dva litička mehanizma za YT staničnu liniju i ti mehanizmi uvjetuju dva različita modela stanične smrti i to posredovane egzocitozom (198). Jedan je ovisan o ekstracelularnom Ca<sup>2+</sup> i uvjetuje apoptotičku smrt, i EGTA rezistentan mehanizam dokazan samo u B7+ ciljeva, a uvjetuje nekrozu ciljnih stanica. CD28 molekula koju izražava YT linija pokreće još jedan dodatni mehanizam staničnog ubijanja koji je neovisan o egzocitozi, a izaziva nekrozu ciljnih stanica.

Degranulaciju YT linije može se spriječiti sa ciklosporinom A (CsA) i sa EGTA koji osim što sprečava degranulaciju sprečava i polimerizaciju perforinskih molekula (198). U našem radu pokušali smo spriječiti degranulaciju perforin pozitivnih stanica stimuliranjem stanica u kulturi preko CD3 molekule (anti-CD3 mAt), CD2 molekule (PHA), receptora za IL-2 (anti-IL2R mAt) i kombinacijom navedenih, ali bez uspjeha. Jedino je kokultivacija perforin pozitivnih stanica s decidualnim makrofagima bila uspješna u preveniranju degranulacije perforina iz perforin<sup>+</sup> stanica tijekom

18-satne kultivacije, a u kombinaciji sa PHA stimulacijom još se i dodatno stimulira perforin u tim stanicama.

Mnogi citokin-receptor sistemi posreduju proliferaciju stanica, difereciranje stanica ili oboje. Neki tipovi apoptoze su također posredovani sa citokinima i njihovim receptorima. Prvotno se sugeriralo da je Fas receptor za jedan neznani faktor koji može posredovati apoptozu, a zatim je izolirana cDNK tog faktora ili Fas ligand, iz CTL staničnih linija (186). Rouvier i suradnici (1993) pokazali su da je Fas uključen i u T staničnu citotoksičnost. Naime, iz njihovih pokusa vidljivo je da je citolitička aktivnost CTL hibridoma d10S ovisna o nivou ekspresije Fas molekule na ciljnim stanicama. Tako je u citotoksičnost posredovanu citotoksičnim T limfocitima uključena još jedna efektorska molekula. Predhodno je dobro opisan put perforinom-posredovane citolize, te je sugerirano da topljiva forma ili oblik TNF koji je veza za membranu, može također biti uključen u različite citolitičke sisteme na ciljnim stanicama. U trudnoći, što smo pokazali u predhodnom radu (203), postoji značajan perforinski citolitički potencijal. U istom radu bilo je vidljivo je da perforin pozitivni DL imaju nisku citolitičku aktivnost u usporedbi s LPK, u kojih je perforin prisutan u značajno manjem postotku. Nadalje, slijedeći rezultate iz ovog rada očito je da Fas ligand, koji se izražava na efektorskim stanicama tijekom citolize, nije prisutan na decidualnim limfocitima tijekom prvog tromjesječja trudnoće. Do njegove ekspresije dolazi u uvjetima pada broja perforin pozitivnih DL, kao što smo pokazali u pokusu 18 satne kultivacije DL. Ako su perforin i Fas-Fas ligand glavni mehanizmi T stanične citotoksičnosti (105), onda možemo reći da naši rezultati pokazuju postojanje perforina u DL prvog tromjesječja normalne trudnoće, ali niske citolitičke aktivnosti, dok Fas-Fas ligand mehanizam nije prisutan, jer smo ekspresiju Fas liganda vidjeli jedino u uvjetima kada dolazi do značajnog pada perforin pozitivnih DL (Slika15 i 15a). Dodatkom adherentnih stanica normalizira se razina perforina u decidualnim limfocitima, a istovremeno ekspresija FasL pada gotovo na nulu (Slika15 i

15a). Budući su mehanizmi posredovani perforinom i Fas-om temeljni citolitički mehanizmi (186), očito postoje i načini na koje ispad jednog sustava može biti kompeziran aktivacijom drugog, te na taj način osigurati zaštitu protiv invazivnih agenasa okoliša. Pokusima *in vivo* s dvostruko deficitnim miševima, pokazali su da je njihov životni vijek kratak, ne mogu se reproducirati, a genitalni trakt ženki je bogato infiltriran s makrofagima. Potiskivanje ekspresije FasL u trudnoći mogao bi biti još jedan u nizu dosad opisanih mehanizama zaštite fetusa kao alotransplantata tijekom normalne trudnoće. Prava uloga postojećeg, ali inaktivnog, perforinskog mehanizma citolize, te alternativnog Fas-Fas ligand mehanizma tijekom normalne trudnoće ostaje, međutim, i dalje nerazjašnjena. Možemo pretpostaviti da imaju značajnu ulogu u višestrukim spontanim pobačajima, te u patološkim trudnoćama i trudnoćama kompromitiranim različitim infektivnim uzročnicima.

Naši rezultati o ekspresiji TJ6 molekule na površini decidualnih limfocita prvog tromjesečja trudnoće su prvi objavljeni rezultati na humanom modelu. Prisustvo TJ6 proteina u fetoplacntnoj jedinici trudnih mišica dokazano je upotrebom Northern i Western blot analize (164). Protein različite molekulske mase prisutan je u fetoplacntnoj jedinici (52kD) i timocitima (67-70kD). Te razlike, kao što pokazuje Northern blot analiza, sugeriraju da se TJ6 protein pojavljuje u različitim tkivima i staničnim linijama u različitim izoformama istog proteina, i da ih je sve moguće prepoznati i definirati upotrebom anti-TJ6 poliklonskog protutijela (164) To pokazuje da različite stanične linije i tkiva produciraju slične transkripte. Naime, TJ6 protein se može postranskripcijski mijenjati u proteine različite veličine (164,129). Rezultati prikazani u ovom radu ukazuju na moguće razlike, na posttranslacijskom nivou, u veličini TJ6 proteina, ali sve izoforme su prepoznate preko iste sekvence aminokiselina upotrebom anti-TJ6 poliklonskog protutijela. Istraživanja *in vivo* su pokazala da se TJ6 protein pojavljuje na površini nekih staničnih linija u veličini 67-70 kD (164,11), od kojeg se odcjepljuje solubilni protein nazvan TJ6s. TJ6s

je peptid od 18 kD i ima ulogu u imunosupresiji i toleranciji. TJ6s je antiproliferativni citokin čija je aktivnost dokazana protiv aktiviranih CD4<sup>+</sup> stanica koje su aktivirane preko T staničnog receptora (143). Za TJ6m postoje indikacije da je uključen u programiranu smrt stanica (apoptozu).

Nalaz prisustva TJ6 proteina u decidualnim stanicama prvog tromjesječja trudnoće upućuje na njegovu lokalnu ulogu, na dodiru majčinih i fetalnih tkiva. Down-regulacija stanicama posredovane imunosti tijekom normalne trudnoće možda je jedan od učinaka TJ6 proteina koji se nalazi u blizini sa ostalim stanicama i njihovim produktima. Možda je imunosupresivna uloga TJ6 proteina od neposredne važnosti za preživljavanje fetoplacentne jedinice. TJ6 možda ima funkcionalnu ulogu u humanoj decidui slično prije objavljenim rezultatima u mišjoj trudnoći. Ekspresija T supresijskog faktora u drenažnim limfnim čvorovima uterusa tijekom trudnoće je najveća u periodu neposredno prije implantacije jajne stanice, održavajući visoki nivo tijekom svih faza trudnoće, te u još višem nivou na kraju trudnoće. Naden je visok nivo u timusu tijekom mišje trudnoće (194). U istom radu pokazano je da bi TJ6 mogao biti odgovoran za T staničnu supresorsku aktivnost, ali TJ6 protein je detektiran iz stanične frakcije, dok površinsku ekspresiju proteina nisu određivali (194). Prisustvo TJ6 proteina je važno u preimplantacijskom periodu trudnoće, što je pokazano u eksperimentu sprečavanja implantacije i razvoja fetoplacentne jedinice, ako su gravidne mišice bile tretirane sa anti-TJ6 protutijelom (11).

TJ6 na LPK je primarno eksprimiran na CD19<sup>+</sup> B stanicama gravida (88% od B pozitivnih stanica) i u nižem nivou (27%) na LPK negravidna. TJ6 protein je samo marginalno prisutan na CD3<sup>+</sup> T stanicama negravidna, i značajno je prisutan na CD56<sup>+</sup> stanicama gravidnih žena, koje su imale višekratne spontane abortuse (194).

Istovremeno obilježavanje TJ6m na DL i LPK pokazalo je statistički značajno više postotke dvostruko pozitivnih stanica među LPK za CD3 (10 : 3%), CD8 (9 : 3%) i CD19 (4,5 : 1%). Razina CD3<sup>+</sup>TJ6m<sup>+</sup> stanica

(10%) i CD56<sup>+</sup>TJ6<sup>+</sup> stanica (4%) u perifernoj krvi analiziranoj u našim eksperimentima je viša nego objavljeni rezultati Nicolsa i suradnika (164), koji su našli 3% i 2%. Porast postotka TJ6<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> stanica u našim eksperimentima mogao bi se objasniti stimulacijom ekspresije TJ6m sa anti-CD3 monoklonskim protutijelom. Naime grupa prof. Beamana iz Chicaga (usmeno priopćenje) pokazala je da anti-CD3 monoklonsko protutijelo može povisiti ekspresiju TJ6m od 3,1% na 41,4% nakon 20 minuta inkubacije. U našem eksperimentu CD3<sup>+</sup> limfociti, u proceduri obilježavanja sa anti-CD3 mAt, bili su inkubirani 30 minuta. Taj rezultat upućuje na važnu ulogu CD3-TCR kompleksa u stimulaciji ekspresije TJ6 proteina. Isti tretman nije imao učinak na veću ekspresiju TJ6m na CD3<sup>+</sup> DL (slika19a). Zastupljenost CD3<sup>+</sup> stanica među TJ6m<sup>+</sup> stanicama (TJ6m = 100%, Slika19) pokazuje razlike između CD3<sup>+</sup> LPK i DL (40% : 22%).

Nichols i suradnici (164) dokazali su prisustvo TJ6 proteina na CD56 pozitivnim stanicama periferne krvi potencijalno abortivnih trudnoća i sugerirali da se različite forme TJ6 proteina izražavaju na NK stanicama. O tim NK stanicama diskutirali su King i suradnici (153\*), Rukavina i suradnici (205) i Coulam i suradnici (39) kao o CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> NK stanicama. Takva ekspresija površinskih antigena pokazana je na tkivnim NK stanicama, ali ne na NK stanicama periferne krvi. Ti nalazi potkrepljuju hipotezu Wegmanna i suradnika (255) koji sugeriraju preživljavanje fetusa zbog imunoregulacijskih učinaka na lokalnom nivou i to preko TH-2 tipa prepoznavanja. To prepoznavanje odvija se u karakterističnom citokinskom okruženju, a i limfocitne podvrste su različite od onih koje možemo naći u tipičnom prepoznavanju nesrodnog presadka.



## 6. ZAKLJUČNI PREGLED

1. Perforin pozitivni limfociti periferne krvi tijekom trudnoće mijenjaju fenotipska obilježja.

Dominantnu populaciju u prvom tromjesječju trudnoće čine  $P^{+}CD56^{bright}CD16^{-}$  stanice (stanice decidualnog fenotipa), dok je na termin poroda uočena dominacija  $P^{+}CD56^{dim}CD16^{+}$  (stanice fenotipa negravidnih žena).

2. 18-satna kultivacija perforin pozitivnih limfocita periferne krvi negravidna, gravidna ili decidualnih limfocita uvjetuje dramatičan pad perforin pozitivnih stanica. Stimulacija ovih stanica sa anti-CD3 mAt, PHA,  $rIL-2$  ili kombinacijom istih ne sprečava gubitak perforina u 18 satnoj kulturi. Međutim, kokultivacija perforin pozitivnih stanica periferne krvi negravidna, gravidna ili decidualnih limfocita s decidualnim makrofagima sprečava gubitak perforinskih molekula iz stanica koje sadrže perforin.

3. Decidualni makrofagi stimuliraju porast perforina u NK i citotoksičkim limfocitima T periferne krvi negravidna. Singenički decidualni makrofagi, uz stimulaciju s PHA, induciraju i povećanje ekspresije perforina, kako u limfocita periferne krvi tako i u decidualnih limfocita.

4. Nestajanje perforina u 18-satnoj kulturi limfocita periferne krvi i decidualnih limfocita popraćeno je istovremenim porastom ekspresije Fas liganda na površini kultiviranih stanica.

5. TJ6m protein prisutan je na površini limfocita periferne krvi i decidue prvog tromjesječja trudnoće. Western blot analiza lizata decidualnih limfocita pokazuje tri trake od približno 67, 60 i 32 KD. Lizat LPK istih

trudnica pokazuje također tri trake u Western blot analizi od približno 67, 50, i 37 KD.

6. TJ6m protein zastupljeniji je na decidualnim limfocitima negoli na limfocitima periferne krvi tijekom prvog tromjesječja trudnoće, i to na CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> i CD19<sup>+</sup> decidualnim limfocitima. AFI za TJ6m pokazuje značajno veću gustoću TJ6m molekula na decidualnim limfocitima u odnosu na limfocite periferne krvi.

7. Stimulacija CD3 molekule s monoklonskim protutijelom izaziva pojačanu ekspresiju TJ6m na površini limfocita periferne krvi.

8. Granuliranost dvostruko pozitivnih decidualnih limfocita (TJ6m<sup>+</sup>CDmarker<sup>+</sup>), veća je od granuliranosti istih stanica periferne krvi. Nije uočena razlika u veličini stanica.

## 7. LITERATURA

1. Abrams SI, Brahmi Z. 1988. Target cell directed NK inactivation: concomitant loss of NK and antibody-dependent cellular cytotoxicity activities. *J Immunol.* 140:2090-2095.
2. Alexander J., Payne J.A., Shikegawa B., Frelinger J., Cresswell P. 1990. The transport of class I MHC antigens is determined by sequence in the alfa 1 and alfa 2 domains. *Immunogenetics* 31:169-175
3. Anderson D.M., Johnson L., Glaccum M.B., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Valentine V., Kirstein M.N., Shapiro D.N., Morris S.W. 1995. Chromosomal assignment and genomic structure of IL-15. *Genomics.* 25:701-706
4. Anderson P., Caligiuri M., O'Brien C., Manley T., Ritz J., Schlossman S.F. 1990. Fc $\gamma$ RIII (CD16) is included in the  $\zeta$  NK receptor complex expressed by human natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:2274-2281
5. Anderson P., Caligiuri M., Ritz J., Schlossman S.F. 1989. CD3-negative natural killer cells express  $\zeta$ TCR as part of a novel molecular complex. *Nature (London)* 341:159-161
6. Andersson L., Jokinen M., Gahmberg C.G. 1979. Induction of erythroid differentiation in the human leukemia cell line K562. *Nature* 278:364-365
7. Arceci R.J., Shanahan F., Stanley E.F., Pollard J.W. 1986. Temporal expression and location of colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and its receptor in the female reproductive tract are consistent with CSF-1-regulated placental development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8818-8822
8. Arici A., Engin O., Attar E., Olive D.L. 1995. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J. Clin. Immunol. Metab.* 80:1908-1915
9. Athanassakis I., Bleackley R.C., Paetkau V., Guilbert L., Barr P.J., Wegmann T.G. 1987. The immunostimulatory effect of T cells and T

- cell lymphokines on murine fetally derived placental cells. *J. Immunol.* 138:37-44
10. Bazan J.F. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6934-6938
11. Beaman K.D., Hoversland R.C. 1994. Induction, of abortion in mice with a monoclonal antibody specific for suppressor T-lymphocyte molecules. *J. Reprod. Immunol.* 26: 217-231.
12. Bell S.C., 1983. Regional differentiation and associated findings. U: Oxford reviews of Reproductive Biology, Vol. 5:220-271.
13. Benirschke K., Kaufmann P. 1990. Pathology of the human placenta. Springer-Verlag New York
14. Bhatt H., Brunet I., Stewart C.L. 1991. Uterine expression of leukemia inhibitory factor (LIF) coincidents with the onset of blastocyst implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:11408-11412.
15. Biassoni R., Ferrini S., Prigione I., Moretta A., Long E.O. 1988. CD3-negative lymphokine activated cytotoxic cells express the CD3 $\epsilon$  gene. *J. Immunol.* 140:1685-1693
16. Bishop P.W., Malam J.E., Morris J.A., Fox H., 1987. Distribution of Ca (Oxford) antigen on placental trophoblast. *J. Pathol.* 151:119-123. 7g.
17. Blieden T. M., McAdam A.J., Frelinger J.G., Lord E.M., 1991. Mechanism of cytolytic T lymphocyte killing of a low class I-expressing tumor. *J. Immunol.* 147:1433-1438.
18. Braun M.Y., Lowin L., French H., Acha-Orbea., Tschopp J. 1996. Cytotoxic T cells deficient in both functional Fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose heir capacity to induce lethal graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* 183:657-661.
19. Brinkmann V., Kristofic C. 1995. TCR-stimulated naive human CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> T cells develop into effector cells that secrete IL-13, IL-5, and IFN-gamma, but no IL-4, and help efficient IgE production by B cells. *J. Immunol.* 154:3078-3087

20. Bruno E., Briddell R.A., Cooper R.J., Hoffman R. 1991. Effects of recombinant interleukin-11 on human megakaryocyte progenitor cells. *Exp. Hematol.* 19:378-38
21. Bulmer J.N. 1989. Decidual cellular responses. *Curr. Opin. Immunol.* 1:1141-1147
22. Bulmer J.N., Johnson P.M. 1985. Immunohistological characterization of the decidual leucocytes infiltrate related to endometrial gland epithelium in early human pregnancy. *Immunol.* 55:35-44.
23. Bulmer J.N., Morrison L., Johnson P.M., Meager A., 1990. Immunohistochemical localization of interferons in human placental tissues in normal, ectopic, and molar pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 22:109-116.
24. Bulmer J.N., Morrison L., Longfellow M., Ritson A. 1991. Leucocytes in human decidua: investigation of surface markers and function. In: cellular and Molecular Biology of the Materno- Fetal relationship, eds. G. Chaouat, J. Mowbray, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. 212:189-196.
25. Bulmer J.N., Morrison L., Longfellow M., Ritson A. 1991. Leucocytes in human decidua: investigation of surface markers and function. In: Cellular and molecular biology of the materno-fetal relationship. 212:189-196
26. Bulmer J.N., Sunderland C.A. 1984. Immunohistological characterization of lymphoid cell populations in the early human placental bed. *Immunol.* 52:349-357.
27. Burrows T.D., King A., Loke Y.W. 1993. Expression of adhesion molecules by human decidual large granular lymphocytes. *Cell. Immunol.* 147:81-87
28. Carson W.E., Giri J.G., Lindemann M.J., Linett M.T., Ahdieh M., Paxton R., Anderson D., Eisenmann J., Grabstein K., Caliguri M.A. 1994. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human

- natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.* 180:1395-1403
29. Casey M.P., MacDonald P.C. 1988. Decidual activation: The role of prostaglandins in labor. In: McNellis D., Challis J., MacDonald P. et al. (eds.) *The Onset of Labor: Cellular and Integrative Mechanisms*. New York: *Perinatology Press*; pp. 141-156
30. Chamberlain J.W., Vasavada H.A., Ganguly S., Weissman S.M. 1991. Identification of *cis* sequences controlling efficient position-independent tissue-specific expression of human major histocompatibility complex class I genes in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 11:3564-3571
31. Chernyshov V.P., Slukvin I.I., Bondarenko G.I. 1993. Phenotypic characterization of CD7+, CD3+ and CD8+ lymphocytes from first trimester human decidua using two-color flow cytometry. *Am. J. Reprod. Immunol.* 29:5-16.
32. Christmas S.E., Bulmer J.N., Meager A., Johnson P.M. 1990. Phenotypic and functional analysis of human CD3- decidual leucocytes clones. *Immunol.* 71:182-189.
33. Chumbley G., King A., Holmes N., Loke Y.W. 1993. *In situ* hybridization and northern blot demonstration of HLA-G mRNA in human trophoblast populations by locus-specific oligonucleotides. *Hum. Immunol.* 37:17
34. Clark D.A. 1983. Impairment of host immunity and survival of the fetus. In: Kay PK ed. *Immunobiology of transplantation, cancer and pregnancy*. New York, *Pergamon press*, pp 278-304.
35. Clark D.A. 1985. Materno-fetal relations. *Immunol. Letters.* 9:239-247.
36. Clark D.A., Falbo M., Rowley R.B., Banwatt D., Stedronska-Clark J. 1988. Active suppression of host vs. graft reaction in pregnant mice. IX. Soluble suppressor activity obtained from allopregnant mouse decidua that blocks the cytolytic effector response to IL-2 related to transforming growth factor-beta. *J. Immunol.* 141:3833-3840

37. Cohen J.J. 1993. Mechanisms of apoptosis. *Immunol. Today*. Vol.14 No 3
38. Cohen S., Pick E., Oppenheim J.J. 1979. In: Pick E., Oppenheim J.J. (eds.) *Biology of the Lymphokines*. New York: Academic Press, pp. 1-7
39. Coulam C.B, Goodman C, Roussev R.G, Thomason E.J, Beaman K.D. 1995 Systemic CD56+ cells can predict pregnancy outcome. *Am. J. Reprod. Immunol.* 33: 40-46.
40. Datter F., Pollard J.W. 1992. Colony stimulating factor-1 (CSF-1) in pregnancy. *Reprod. Med. Rev.* 1:83-97.
41. David-Watine B., Israel A., Kourilsky P. 1990. The regulation and expression of MHC class I genes. *Immunol. Today* 11:286-290
42. Davis S., Aldrich T.H., Valenzuela D.M., Wong V., Furth M.E., Squinto S.P., Yancopoulos, G.D. 1991. The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 253:59-62
43. Daya S., Clark D.A. 1990. Immunoregulation at the maternofetal interface. *Immunol. Allergy. Clinics. North. Am.* 10:49-65.
44. Dennert G., Podack E.R. 1983. Cytolysis by H-2-specific T killer cells: Assembly of tubular complexes on target membranes. *J. Exp. Med.* 157:1483-1495
45. Devlin E.E., Arabian A., Glorieux F.H., Mamer O.A. 1985. *In vitro* metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by isolated cells from human decidua. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 60:880-885
46. Dietl J., Ruck P., Horny H.P., Handgretinger R., Marzusch K., Kaiserling E., Griesser H., Kabelitz D. 1992. The decidua of early human pregnancy: Immunohistochemistry and function of immunocompetent cells. *Gynecol. Obstet. Invest.* 33:197-204.
47. Dinarello C.A. 1988. Interleukin-1 $\alpha$ . *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 546:122-132
48. Dorshkind K., Pollack S.B., Bosma M.J., Phillips R.A. 1985. Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (scid). *J. Immunol.* 134:3798-3803

49. Dudley D.J., Trautman M.S., Edwin S.S., Lundin-Schiller S., Mitchell M.D. 1992b. Biosynthesis of interleukin-6 by human chorion laeve cells: regulation by cytokines. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 75:1081-1086
50. Dudley D.J., Trautman M.S., Edwin S.S., Mitchell M.D. 1992. Decidual biosynthesis of interleukin-6 and its regulation by cytokines. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 74:884-889
51. Eades D.K., Corneium P., Pekala P.H. 1988. Characterization of tumor necrosis factor receptor in human placenta. *Placenta* 9:247-251
52. Ellis S.A., Palmer M.S., McMichael A.J. 1990. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA class I molecule. *J. Immunol.* 144:731
53. Epstein H., Hardy R., May J.S., Johson M.H., Holmes N. 1989. Expression and function of HLA-A2 in transgenic mice. *Eur. J. Immunol.* 19:1575-1581
54. Evan G.I., Wyllier A.H., Gilbert C.S., Littlewood T.D., Land H., Brooks M., Warers C.M., Penn L.Z., Hancock D.C. 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69:119-128.
55. Faulk W.P., McIntire J.A. 1983. Immunological studies of human trophoblast: markers, subsets and functions. *Immunol. Rev.* 75:139-151
56. Fenton M.T., Clark B.D., Collins K.L., Webb A.C., Rich A., Auron P.E. 1987. Transcriptional regulation of the human pro-interleukin-1 beta gene. *J. Immunol.* 138:3972-3979
57. Fiorentino D.F., Zlotnik A., Vieira P., Mosmann T.R., Howard M., Moore K.W., O'Garra A. 1991. IL-10 acts on the antigen presenting cell to inhibit cytokine production by Th 1 cells. *J. Immunol.* 146:3444-3451
58. Flaherty L., Elliott E., Tine J.A., Walsh A.C., Waters J.B. 1990. Immunogenetics of the Q and T1 regions of the mouse. *CRC Crit. Rev. Immunol.* 10:131-140
59. Ford R., Tamayo A., Martin B., Niu K., Claypool K., Cabanillas F., Ambrus J. Jr. 1995. Identification of B-cell growth factors (interleukin-



- 14; high molecular weight-B-cell growth factors) in effusion fluids from patients with aggressive B-cell lymphomas. *Blood*. 86:283-293
60. Fraser P, Pruzina S, Antoniou M, Grosveld F. 1993. Each hypersensitive site of the human  $\beta$ -globin locus control region confers a different developmental pattern of expression on the globin genes. *Genes and Devel.* 7:106-111
61. Geraghty D.E., Koller B.H., Hansen J.A., Orr H.T. 1992. The HLA class I gene family includes at least six genes and twelve pseudogenes and gene fragments. *J. Immunol.* 149:1934-1940
62. Geraghty D.E., Koller B.H., Orr H.T. 1987. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9145-9151
63. Gersdorff H., Matthews. 1994. Inhibition of endocytosis by elevated internal calcium in a synaptic terminal. *Nature*. 370: 352-354.
64. Gill III T.J. 1994. Reproductive immunology and immunogenetics, in Knobil E and Neill DJ (eds): *The Physiology of Reproduction*, New York, *Raven Press*, pp. 783-812.
65. Ginsberg D., Michael-Michalovitz D., Ginsberg D., Oren M. 1991. Induction of growth arrest by a temperature-sensitive p53 mutant is correlated with increased nuclear localization and decreased stability of the protein. *Mol. Cell. Biol.* 11: 582-585.
66. Giri J.G., Kumaki S., Ahdieh M., Friend D.J., Loomis A., Shanebeck K., DuBose R., Crosman D., Park L.S., Anderson D.M. 1995. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J.* 14:3654-3663
67. Goustin A.S., Betsholtz C., Preifer-Ohlsson S., Persson H., Rydnert J., Ywater M., Holmgren G., Heldin C.H., Westermark B., Ohlsson R., 1985. Co-expression of the *Sis* and *Myc* protooncogenes in developing human placenta suggests autocrine control of trophoblast Growth. *Cell* 41:301-312.

68. Grabowska A., Garter N., Loke Y.W., 1990. Human trophoblast cells in culture express an unusual major histocompatibility complex class I-like antigen. *Am. J. Reprod. Immunol.* 23:10-18.
69. Griffin J.D., Hercend T., Beveridge R., Schlossman S.F. 1983. Characterization of an antigen expressed on human natural killer cells. *J. Immunol.* 130:2947-2953
70. Griffiths G.M., Mueller C. 1991. Expression of perforin and granzymes in vivo: Potential diagnostic markers for activated cytotoxic cells. *Immunol. Today* 12:415-419
71. Grimm E.A., Mazumder A., Zhang H.Z., Rosenberg S.A. 1982. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 155:1823-1830
72. Grimm E.A., Robb R.J., Roth J.A., Neckers L.M., Lachman L.B., Wilson D.J., Rosenberg S.A. 1983. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. *J. Exp. Med.* 158:1356-1364
73. Grimm E.A., Wilson D.J., Rosenberg S.A. 1983. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. II. The precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory CTL, and NK cells. *J. Exp. Med.* 157:884-890
74. Gubler U., Chua A.O., Schoenhaut D.S., Dwyer C.M., McComas W., Motyka R., Nabavi N., Wolitzky A.G., Quinn P.M., Familletti P.C., Gately M.K. 1991. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4143-4147
75. Gulan G., Podack ER., Rukavina D., Gudelj L., Rubeša G., Petrović O., Johnson PM., Christmas SE. Perforin-expressing lymphocytes in peripheral blood and decidua of human first-trimester pathological pregnancies. *Am. J. of Reproductive Immunology* (prihvaćen 1996.)

76. Guy-Grand D., Malassies-Seris M., Briottet C., Vassalli P. 1991. Cytotoxic differentiation of mouse gut thymodependent and independent intraepithelial T lymphocytes is induced locally, correlation between functional assays, presence of perforin and granzyme transcripts, and cytoplasmic granules. *J. Exp. Med.* 173:1549-1552
77. Hackett J.J., Bosma G.C., Bosma M.J., Bennet M., Kumar V. 1986. Transplantable progenitors of natural killer cells are distinct from those of T and B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:3427-2432
78. Haller H. 1991. Imunohistološka karakterizacija i imunosupresijska aktivnost decidualnih limfocita u prvom tromjesečju trudnoće. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci.
79. Harel-Bellan A., Quillet A., Marchiol C., DeMars R., Trsz T., Fradelizi D. 1986. Natural killer susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:5688-5696
80. Haynes B.F., Denning S.M., Singer K.H., Kurzberg J. 1989. Ontogeny of T-cell precursors: A model for the initial stage of human T-cell development. *Immunol. Today* 10:87-91
81. Head J.R., Billingham R.E. 1986. Concerning the immunology of the uterus. *Am. J. Reprod. Immunol.* 10:76-81.
82. Heberman R.B., Nunn M.F., Lavrin D.H. 1975. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer.* 16:230-239
83. Heberman R.B. 1987. Lymphokine-activated killer cell activity. Characteristics of effector cells and their progenitors in blood and spleen. *Immunol. Today* 167:174-180
84. Hercend T., Griffin J.D., Bensussan A., Schmidt R.E., Edson M.A., Brennan A., Murray C., Daley J.F., Schlossman S.F., Ritz J. 1985. Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens. NKH1A and

- NKH2, expressed on a subset of large granular lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 75:932-937
- 85.Hercend T., Reinherz E.L., Meuer S., Schlossman S.F., Ritz J. 1983. Phenotypic and functional heterogeneity of human cloned natural killer cell lines. *Nature* 301:158-161
- 86.Houlihan J.M., Ferger-Payne A., Biro P.A. Simpson K.L., Holmes C.H. 1992. Evidence for expression of non HLA-A, -B, or -C class I genes in the human fetal liver. *J. Immunol.* 149:668-675
- 87.Hoversland R.C., Beaman K.D. 1990. Embryo implantation associated with increase in T-cell suppressor factor in the uterus and spleen of mice. *J. Reprod. Fert.* 88:135-139.
- 88.Hsi B.-L., Simson M., Grivaux C., Fenichel P., Hunt J.S., Yeh C.-J.G. 1988. Topographical expression of class I major histocompatibility complex antigens on human amniotic epithelium. *J. Reprod. Immunol.* 13:183-189
- 89.Hsi B.L., Yeh C.J.G., Fenichel P., Samson M., Grivaux C., 1988. Monoclonal antibody GB24 recognizes a trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 18:21-27. 38g.
- 90.Hunt J., Andrews G.K., Wood G.W., 1987. Normal trophoblast resist induction of class I HLA. *J. Immunol.* 138:2481-2487.
- 91.Hunt J.S. 1992. Immunobiology of pregnancy. *Current Opinion and Immunology* 4:591-596.
- 92.Hunt J.S., Hsi B.L. 1990. Evasive strategies of trophoblast cells: Selective expression of membrane antigens. *Am. J. Reprod. Immunol.* 23:57-63.
- 93.Hunt J.S., Orr H.T. 1992. HLA and maternal-fetal recognition. *FASEB J.* Vol. 6:2344-2348.
- 94.Ishitani A., Geraghty D.E. 1992. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3947-3953

95. Itoh N., Nagata S. 1993. A novel protein domain required for apoptosis, mutational analysis of human fas antigen. *J. Biol. Chem.* 268:10932-10937.
96. Jaffe L., Jeannotte L., Bikoff E.K., Robertson E.J. 1990. Analysis of beta-microglobulin gene expression in the developing mouse embryo and placenta. *J. Immunol.* 145:3474-3482.
97. Johnson P.M. 1991. Defined trophoblast antigens. Workshop report. *Am. J. Reprod. Immunol.* 11:13-14
98. Johnson P.M. 1993. Immunobiology of the human placental trophoblast. *Exp. Clin. Immunogenet.* 10:118-122.
99. Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen K, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin deficient mice. *Nature* 1994; 369:31-37.
100. Kagi D., Lederman B., Burki K., Seiler P., Odermatt B., Olsen K.J., Podack E.R., Zinkernagel R.M., Hengartner H. 1994. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin deficient mice. *Nature* 369:31-34
101. Kagi D., Seiler P., Pavlovic J., Ledermann B., Burki K., Zinkernagel R.M., Hengartner H. 1995. The roles of perforin- and Fas-dependent cytotoxicity in protection against cytopathic and noncytopathic viruses. *Eur. J. Immunol.* 25:3256-3262
102. Kagi David, Vignaux F., Ledermannn B., Burki K., Depraetere V., Nagata S., Hengartner H., Goldstein P. 1994. Fas and perforin as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* 265:528-530.
103. Kataoka K., Naomoto K., Shiozaki S., Matsuono T., Sakagami K., Okumura K., Orita K. 1992. Infiltration of perforin positive mononuclear cells into rejected kidney allografts. *Transplantation* 23:314-320
104. Kawasaki A., Shinaki Y., Kuwana Y., Furuya A., Iigo Y., Hannai N., Itoh S., Yagita H., Okumura K. 1990. Perforin, a pore-forming protein detectable by monoclonal antibodies, is a functional marker for killer cells. *Int. Immunol.* 2:667-684

- 105.Kawasaki A., Shinaki Y., Yagita H., Okumura K. 1992. Expression of perforin in murine natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Eur. J. Immunol.* 24:412-419
- 106.King A, Loke WY. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunol Today.* 1991; 12:432-435.
- 107.King A., Chumbley G., Loke Y.W., 1991. Isolation and characterisation of extravillous trophoblast and uterine large granular lymphocytes and their interaction in vitro. In: Cellular and molecular biology of materno-fetal relationship. Eds. G. Chaouat, J. Mowbray. Colloque INSERM; John Libbey Eurotext Ltd. London, Vol 212, pp. 103-111.
- 108.King A., Loke Y.W. 1991. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunol. Today* 12:432-435
- 109.Kirszenbaum M., Moreau P., Gluckman E., Dausset J., Carosella E. 1994. An alternative in spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4209-4215
- 110.Kobata T., Shinaki Y., Iigo Y., Kawasaki A., Yagita H., Ito S., Shimada S., Katz S.I., Okumura K. 1990. Thy-1-positive dendritic epidermal cells contain a killer protein perforin. *Int. Immunol.* 2:1113-1116
- 111.Kojima H., Shinohara N., Hanaoka S., Someya-Shirota Y., Takagaki Y., Ohno H., Saito T., Katayama T., Yagita H., Okumura K. 1994. Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1:357-364
- 112.Koller B.H., Orr H.T. 1985. Cloning and complete sequence of an HLA-A2 gene: Analysis of two HLA-A alleles at the nucleotide level. *J. Immunol.* 134:2727-2733
- 113.Kovats J., Librach C., Fisch P., Main E.K., Sondel P.M., Fisher S.J., DeMars R. 1992. Expression and possible function of the HLA-G alpha chain in human cytotrophoblast, in: Chaouat G, Mowbray J, (eds):

- Cellular and Molecular Biology of Materno-Fetal Relationship. Paris, J Libbery Eurotex; Collques INSERM pp. 212:21-29.
- 114.Kovats S., Main E.K., Librach C., Stubblebine M., Fisher S.J., De Mars R. 1990. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblast. *Science* 248:220-223
- 115.Kraft D., Lannier L.L. 1984. The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: Phenotypic, functional and comparative studies using monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 133:180-187
- 116.Kwak JHY, Beaman KD, Gilman-Sachs A, Ruiz JE, Schewitz D, Beer AE. Up-regulated expression of CD56<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>, and CD19<sup>+</sup> cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34:93-99.
- 117.Lala P.K., Parhar R.S., Kearns M. 1986. Immunological aspects of decidual response. In: *Reproductive Immunology*. Amsterdam, Elsevier Science Publisher, pp. 191-198
- 118.Lancki D.W., Hsieh C.S., Fitch F.W. 1991. Mechanisms of lysis by cytotoxic T lymphocyte clones. Lytic activity and gene expression in cloned antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Immunol.* 146:3242-3249.
- 119.Lancki D.W., Hsieh C.S., Fitch F.W. 1991. Mechanisms of lysis by cytotoxic T lymphocyte clones. Lytic activity and gene expression in cloned antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Immunol.* 146:3242-3249 163\*
- 120.Lanier L.L., Chang C., Spits H., Phillips J.H. 1992. Expression of cytoplasmic CD3 epsilon proteins in activated human adult natural killer (NK) cells and CD3 gamma, delta, epsilon complexes in fetal NK cells; implications for the relationship of NK and T lymphocytes. *J. Immunol.* 149:1876-1883
- 121.Lanier L.L., Cwirla S, Phillips J.H. 1986. Genomic organization of T cell  $\gamma$  genes in human peripheral blood natural killer cells. *J. Immunol.* 137:3375-3381

- 122.Lanier L.L., Gumprez J.E., Parham P., Melero I., Lopez-Botet M., Phillips J.H. 1995. The NKB-1 and HP-3E4 NK cell receptors are structurally distinct glycoproteins and independently recognize polymorphic HLA-B and HLA-C molecules. *J. Immunol.* 155:4934-494
- 123.Lanier L.L., Phillips J., Hackett J., Tutt M., Kumar V. 1986. Natural killer cells: Definition of a cell type rather than a function. *J. Immunol.* 137:2375-2382
- 124.Lanier L.L., Spits H., Phillips J.H. 1992. The developmental relationship between NK cells and T cells. *Immunol. Today* 13:392-395 169 \*
- 125.Lanier L.L., Yu G., Phillips J.H. 1989. Co-association of CD3  $\zeta$  with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* 342:803-805
- 126.Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. 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.* 1986; 136:4480-4486.
- 127.Larson R.S., Springer T.A. 1990. Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol. Rev.* 114:181-192
- 128.Lata J.A., Cowchock F.S., Jackson L.G., Smith J.B., 1990. Cell surface antigen expression of first trimester chorionic villus samples. *Am. J. Reprod. Immunol.* 22:18-25.
- 129.Lee CK., Chosal K., Beaman K.D. 1990. Cloning of a cDNA for a T-cell produced molecule with a putative immune regulatory role. *Mol. Immunol.* 27:1137-1144.
- 130.Lengrova A., Matousek V. 1979. Another look at the molecular variability of H-2 gene products. *J. Immunogenet.* 6:329-340
- 131.Lichtenheld G.M., Olsen K.J., Lu P., Lowery D.M., Hameed A., Hengertner H., Podack E.R. 1989. Structure of the human perforin gene. *Nature* 335:448-451



- 132.Lichtenheld M.G., Podack E.R. 1989. Structure of the human perforin gene: A simple gene organization with interesting potential regulatory sequences. *J. Immunol.* 143:4267-4274
- 133.Littman B.H., Dastvan F.F., Carlson P.L., Sanders K.M. 1989. Regulation of monocyte/macrophage C2 production and HLA-DR expression by IL-4 (OSF-1) and IFN-gamma. *J. Immunol.* 142:520-525
- 134.Liu C-C., Rafii S., Granelli-Piperno A., Trapani J.A., Young J.D-E. 1989. Perforin and serine esterase gene expression in stimulated human T cells. *J. Exp. Med.* 170:2105-2118
- 135.Liu C-C., Steffen M., King F., Young J.D-E. 1987. Identification, isolation and characterization of a novel cytotoxin in cytolytic murine lymphocytes. *Cell* 51:393-403
- 136.Liu C-C., Walsh C.M., Young J. D-E. 1995. Perforin: structure and function. *Immunol. Today* 16:194-206
- 137.Liu C-C., Afili S., Granelli-Piperno A., Traapani J.A., Young J.D.E. 1989. Perforin and serine esterase gene expression in stimulated human T cells. *J. Exp. Med.* 170:2105-2118
- 138.Liu C.C., Parr E.L., Young Y.D. 1994. Granulated lymphoid cells of the pregnant uterus: Morphological and functional features. *Int. Rev. Cytol.* 153:105-136
- 139.Loke Y.W., King A. 1991. Recent developments in the human maternal-fetal immune interaction. *Current Opinion in Immunology* 3:762-766.
- 140.Lowin B., Hahne M., Mattmann C., Tschopp J. 1994. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated trough perforin and Fas lytic pathways. *Nature.* 370: 650-652.
- 141.Lowrwy D.V., Aebischer T., Olsen K., Lichtenheld M., Rupp F., Hengartner H., Podack E.R. 1989. Cloning analysis and expression of murine perforin 1 cDNA, a component of cytolytic T-cell granules with homology to complement component C9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:247-251

142. Macpherson T.A., Ho H.N., Kunz H.W., Gill T.J. III. 1986. Localization of the Pa antigen on the placenta of the rat. *Transplantation* 41:392-394
143. Mandal M., Beaman K.D. 1995. Purification and characterisation of a pregnancy-associated protein: TJ6s. *Am. J. Reprod. Immunol.* 33:60-67. T3.
144. Manolson M.F., Proteau D., Preston R.A., Stenbit A., Roberts B.T., Hoyt M.A., Preuss D., Mulholland J., Botstein D. and Jones E.W. 1992. *J. Biol. Chem.* 267:14294
145. McIntyre J.A. 1988. In search of trophoblast-lymphocyte cross reactive (TLX) antigen. *Am. J. Reprod. Immunol.* 17:100-110. 62g
146. McLean J.M., Mosley J.G., Gibbs A.C.C. 1974. Changes in thymus, spleen and lymph nodes during pregnancy and lactation in the rat. *J. Anat.* 118:223-229
147. Miyawaki T., Uehara T., Nibu R., Tsuji T., Yachie A., Yonehara S., Taniguchi N. 1992. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulation in human peripheral blood. *J. Immunol.* 149:3753.
148. Moingeon P., Lucich J.L., McConkey D.J., Letourneur F., Malissen B., Kochan J., Chang H.C., Rodewald H.R., Reinherz E.L. 1992. CD3 zeta dependence of the CD2 pathway of activation in T lymphocytes and natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:1492-1499
149. Moingeon P., Stebbins C.C., Dadaurio L., Lucich J., Reinherz E.L. 1990. Human natural-killer cells and mature lymphocytes-T express identical CD3- $\zeta$  subunits as defined by cDNA cloning and sequence analysis. *Eur. J. Immunol.* 20:1741-1746
150. Moretta A., Bottino C., Pende D., Tripoldi G., Tambussi G., Viale O., Orengo A.M., Barbaresi M., Merli A., Ciccone E., Moretta L. 1990. Identification of four subsets of human CD3-CD16<sup>+</sup> NK cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules. Correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J. Exp. Med.* 172:1589-1598

151. Moretta A., Poggi A., Pende D., Tripodi G., Orengo A.M., Pella N., Augugliaro R., Bottino C., Ciccone E., Moretta L. 1991. CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: Anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor  $\alpha/\beta$ . *J. Exp. Med.* 174:1393-1401
152. Moretta L., Ciccone E., Mingari M.C., Biassoni R., Moretta A. 1994. Human natural killer cells: origin, clonality, specificity, and receptors. *Adv. Immunol.* 55:341-380
153. Morii T., Nishikawa K., Saito S., Enomoto M., Ito A., Kurai N., Shimoyama T., Ichijo M., Narita N. 1993. T-cell receptors are expressed but down-regulated on intradecidual T lymphocytes. *Am. J. Reprod. Immunol.* 29:1-4.
154. Mosley J.G., McLean J.M., Gibbs A.C.C. 1975. The response of iliac lymph nodes to the fetal allograft. *J. Anat.* 119:619-623
155. Mueller U.W., Hawes C.S., Jones W.R. 1986. Cell surface antigens at human trophoblast: Definition of an apparently unique system with a monoclonal antibody. *Immunology* 59:135-138.
156. Nagasawa R., Gross J., Kanagawa O., Townsend K., Lanier L.L., Chiller J., Allison J.P. 1987. Identification of a novel T cell surface disulphide-bonded dimer distinct from the  $\alpha/\beta$  antigen receptor. *J. Immunol.* 138:815-822
157. Najarian J.S., Dixon F.J. 1963. Induction of tolerance to skin homografts in rabbits by alternations of placental permeability. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 112:136-138
158. Nakanishi H., Monden T., Kobayashi T., Shimano T., Mori T., 1991. Perforin expression in lymphocytes infiltrated to human colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, 64:239-242.
159. Nakata M., Smyth M.J., Norihisa Y., Kawasaki A., Shinkai Y., Okumura K., Yagita H. 1990. Constitutive expression of pore-forming

- protein in peripheral blood T cells: Implication for their cytotoxic role in vivo. *J. Exp. Med.* 172:1877-1880
160. Namen A.E., Schmierer A.E., March C.J., Overell R.W., Park L.S., Urdal D.L., Mochizuki D.Y. 1988. B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of growth factor active on lymphocyte precursors. *J. Exp. Med.* 167:988-1002
161. Nathan C., Sporn M. 1991. Cytokines in context. *J. Cel. Biol.* 113:981-986
162. Nathan P., Gonzalez E., Miller B.G. 1960. Tolerance to maternal skin grafts in rabbits induced by hyaluronidase. *Nature* 188:77-78
163. Nichols T.C., Kang J.A., Angkachatchai V., Beer A.E., Beaman K.D. 1994. Expression of a membrane form of the pregnancy-associated protein TJ6 on lymphocytes. *Cell Immunol.* 154:219-229
164. Nicols T.C., Kang J., Angkachatchai V., Beer A.E. and Beaman K.D. 1994. Expression of membrane form of the pregnancy-associated protein TJ6 on lymphocytes. *Cell. Immunol.* 155:219-229.
165. Nicols T.C., Kang J.A., Gibson D.F.C. and Beaman K.D. A role for the pregnancy associated protein TJ6 in glucocorticoid and activation induced apoptosis. *J. Leucocyte Biol.* (in press).
166. Nishino E., Matsuzaki N., Masuhiro K., Kameda T., Taniguchi T., Takagi T., Saji F., Tanizawa O. 1991. Trophoblast-derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor on human trophoblasts. *J. Clinical Endocrinol. Metabol.* 71:436-441
167. O'rourke A.M., Rogers J., Mescher M.F. 1990. Activated CD8 binding to class I protein mediated by the T-cell receptor results in signalling. *Nature* 346:187-189.
168. Oehm A.I., Behrmann I., Falk W., Pawlita M., Maier G., Klas C., Li-Weber M., Richards S., Dhein J., Trauth B.C., Ponsting H., Krammer P.H. 1992. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor

- receptor superfamily: sequence identity with the Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 267:10709.
169. Ogra S.S., Ogra P.L. 1978. Immunologic aspects of human colostrum and milk. I. Distribution of characteristic and concentration of immunoglobulins at different times after the onset of lactation. *J. Pediatr.* 92:546-549
170. Oksenberg J.K., Yosef S.N., Ezra Y., Brautbar C. 1988. Antigen presenting cells in human decidual tissue: Role of accessory cells in the activation of suppressor cells. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 16:151-158
171. Orentreich N., Brind J.L., Rizer R.L., Vogelmann J.H. 1984. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 59:551-555
172. Ortaldo J.R., Oldham R.K., Cannon G.C., Heberman R.B. 1977. Specificity of natural cytotoxic reactivity of normal human lymphocytes against a myeloid leukemia cell line. *J. Natl. Cancer Inst. (U.S.)* 59:77-84
173. Otsuka T., Miyajima A., Brown N., Otsu K., Abram J., Sealand S., Caux C., De Wall Malefijt R., DeVries J., Mayerson P., Yokota K., Gemmel L., Rennick D., Lee F., Arai N., Arai K, Yokota T. 1988. Isolation and characterization of an expressible cDNA encoding human IL-3: induction of IL-3 mRNA in human T cell clones. *J. Immunol.* 140:2288-2295
174. Owen-Schaub L.B., Yonehara S., Crump W.L., Grimm E.A. 1992. DNA fragmentation and cell death is selective triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. *Cell Immunol.* 140:197.
175. Owens G.P., Hahn W.E., Cohen J.J. 1991. Identification of mRNAs associated with programmed cell death in immature thymocytes.
176. Pace D., Longfellow M., Bulmer J.N. 1991. Characterisation of intraepithelial lymphocytes in human endometrium. *J. Reprod. Fertil.* 91:165-170

177. Pace D., Morrison L., Bulmer J.N. 1989. Proliferative activity in endometrial stromal granulocytes throughout the menstrual cycle and early pregnancy. *J. Clin. Pathol.* 42:35-39 248
178. Parham P., Lomen C.E., Lawlor D.A., Ways J.P., Holmes N., Coppin H.L., Salter R.D., Wan A.M., Ennis P.D. 1988. Nature of polymorphism in HLA-A, -B, and -C molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4005-4012
179. Parhar R.S., Yagel S., Lala P.K. 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
180. Park L.S., Friend D., Sassenfeld H.M., Urdal D.L. 1987. Characterization of human B cell stimulatory factor 1 receptor. *J. Exp. Med.* 166:476-488
181. Parmelley J.J., Beer A.E., Billingham R.E. 1976. *In vitro* studies of the T lymphocytes population of human milk. *J. Exp. Med.* 144:358-370
182. Paul S.R., Bennett F., Calvetti J.A., Kellher K., Wood C.R., O'Hara R.M., Leary A.C., Sibley B., Clark S.C., Williams D.A., Yang Y-C. 1990. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin-11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7512-7516
183. Peel S., Stewart I. 1989. Rat granulated metrial gland cells differentiate in pregnant chimeric mice and may be cytotoxic for mouse trophoblast. *Cell. Differ. Dev.* 28:55-64
184. Piontek G.E., Taniguchi K., Ljunggren, H.G., Gronberg A., Kiessling R., Klein G., Kärre K. 1985. YAC-1 MHC class I variants reveal an association between decreased NK sensitivity and increased H-2 expression after interferon treatment or *in vivo* passage. *J. Immunol.* 135:4281-4287
185. Podack E.R. 1988. Granule-mediated cytotoxicity of target cells. In: Current topics in microbiology and immunology 140:1-7 Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.

- 186.Podack E.R. 1995. Execution and suicide: cytotoxic lymphocytes enforce Draconian laws through separate molecular pathways. *Current Opinion and Immunol.* 7:11-16.
- 187.Podack E.R., Konigsberg P.J. 1984. Cytolytic T-cell granules: Isolation, structural, biochemical and functional characterisation. *J. Exp. Med.* 160:695-710.
- 188.Poggi A., Biassoni R., Pella N., Paolieri F., Bellomo R., Bertolini L., Moretta L., Mingari M.C. 1990. *In vitro* expansion of CD3/TCR-human thymocyte populations that selectively lack CD3 gene expression: A phenotypic and a functional analysis. *J. Exp. Med.* 172:1409-1414
- 189.Poggi A., Sargiacomo M., Biassoni R., Pella N., Sivori S., Revello V., Costa P., Valtieri M., Russo G., Mingari M.C., Peschle C., Moretta L. 1993. Extra-thymic differentiation of T lymphocytes and natural killer cells from human embryonic liver precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:4465-4471
- 190.Rao L., Debbas M., Sabbatini P., Hockenbery D., Korsmeyer S., White E. 1992. The adenovirus E1A protein induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19kDa and Bcl-2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(16):7742-7746.
- 191.Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 1991; 9:457-
- 192.Readline R.W., McKay D.B., Vauzquez M.A., Papaioannou V.E., Lu C.Y. 1990. Macrophage functions are regulated by the substratum of murine decidual stromal cells. *J. Clin. Invest.* 85:1951-1958.
- 193.Reinherz E.L., Meuer S., Fitzgerald K.A., Hussey R.E., Levine H., Schlossman S.F. 1982. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. *Cell* 30:735-740
- 194.Ribbing S.L., Hoverland R.C., Beaman K.D. 1988. T cell suppressor factor play an integral role in preventing fetal rejection. *J. Reprod. Immunol.* 14: 83-95.

195. Ritson A., Bulmer J.N. 1987. Endometrial granulocytes in human decidua react with a natural killer (NK) cell marker NKH-1. *Immunology* 62:329-331
196. Robertson S.A., Mayrhofer G., Seamark R.F. 1990 Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-6 (IL-6) in pregnant and non-pregnant mice. *Biol. Reprod.* 46:1069-1079.
197. Robertson S.A., Seamark R.F. 1991. uterine granulocyte-macrophage colony stimulating factor in early pregnancy: Cellular origin and potential regulators. *Mol. Biol. of the Feto-Maternal Relationship. Colloque INSERM 212.* Edited by Mowbray Jf, Chaouat G. Paris: Editions John Libbey Eurotext.
198. Roger R., Breard J., Comisso M., Bohuon C., Pallardy M., Bertoglio J. 1996 CD28-mediated cytotoxicity of YT natural killer cells on B7-positive target induces rapid necrotic death independent of granule exocytosis. *Cell Immunol.* Feb. 25; 168(1): 24-32.
199. Rossant J., Mauro V.M., Croy B.A. 1982. Importance of trophoblast genotype for survival of interspecific murine chimeras. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 69:141-149
200. Royer H.D., Ramarli D., Acuto O., Campen T.J., Reinherz E.L. 1985. Genes encoding the T-cell receptor and subunits are transcribed in an ordered manner during intrathymic ontogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:5510-5517
201. Rubeša Gordana 1993. Magistarski rad: Zastupljenost i fenotipska obilježja perforin pozitivnih stanica u perifernoj krvi i decidui prvog tromjesečja trudnoće. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci.
202. Rukavina D, Balen-Marulić S., Rubeša G., Orlić P., Vujaklija K., and Podack ER. 1996. Perforin expression in peripheral blood lymphocytes in rejecting and tolerant kidney transplant recipients. *Transplantation* vol. 61, 285-291.



203. Rukavina D, Rubesa G, Gudelj L, Haller H, Podack ER. Characteristics of perforin expressing lymphocytes within the first trimester decidua of human pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 1995; 33:394-404.
204. Rukavina D., Kapović M., Radojčić A. 1991. Immunoregulatory factors contributing to fetal allograft survival. *Int. J. Dev. Biol.* 35:275-278. 82g
205. Rukavina D., Rubeša G., Gudelj L., Podack E.R. 1996. Human decidual lymphocytes: phenotype, perforin expression and function. *Reg. Immunol.* Vol. 6.
206. Ryan J.C., Niemi E.C., Goldfien R.D., Iserodt J.C., Seaman W.E. 1991. NKR-P1, an activating molecule on rat natural killer cells, stimulates phosphoinositide turnover and a rise in intracellular calcium. *J. Immunol.* 147:3244-3249
207. Salcedo T.W., Azzoni L., Wolf S.F., Perussia B. 1993. Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells. *J. Immunol.* 151:2511-2520
208. Salter R.D., Norment A.M., Shen B.P., Clayberger C., Krensky A.M., Littman D.R., Parhman P., 1989. Polymorphism in the alpha 3 domain of HLA A molecules effects binding to CD8. *Nature* 338:345-349.
209. Sanders S.K., Giblin P.A., Kavaths P. 1991. Cell-cell adhesion mediated by CD8 and human histocompatibility leucocyte antigen G, a nonclassical major histocompatibility complex class I molecule on cytotrophoblast. *J. Exp. Med.* 74:737-740.
210. Sawai K., Matsuzaki N., Kameda T., Hashimoto K., Okada T., Shimoya K., Nobunaga T., Taga T., Kishimoto T., Saji F. 1995. Leukemia inhibitory factor produced at the fetomaternal interface stimulates chorionic gonadotropin production: its possible implication during pregnancy including implantation period. *J. Clin. Immunol. Metab.* 80:1449-1456

- 211.Schieferdecker H.L., Ulrich R., Weiss-Breckwoldt A.N. 1990. The HML-1 antigen of the intestinal lymphocytes is an activation antigen. *J. Immunol.* 144:2541-2547
- 212.Schmidt C.M., Ehlenfeldt R.G., Athanasiou M.C., Duvick L.A., Heinrichs H., David C.S., Orr H.T. 1993. Extraembryonic expression of the human MHC class I gene HLA-G in transgenic mice. *J. Immunol.* 151:2633-2639
- 213.Schmidt C.M., Orr H.T. 1993. Maternal fetal interactions: the role of the MHC class I molecule HLA-G. *CRC Crit. Rev. Immunol.* 13:207-216
- 214.Schmidt C.M., Orr H.T. HLA-G transgenic mice: a model for studying expression and function at the maternal/fetal interface. *Immunol. Rev.* 147:53-65
- 215.Schmitt E., Beuscher H.U., Huels C., Monteyne P., Van Brandwijk R., Van Snick J., Ruede E. 1991. IL-1 serves as a secondary signal for IL-9 expression. *J. Immunol.* 147:3848-3854
- 216.Scott C.F. Jr., Bolender S., McIntyre G.D., Holldack J., Lambert J.M., Venkatesh Y.P., Morimoto C., Ritz J., Schlossman S.F. 1989. Activation of human cytolytic cells through CD2/T11. *J. Immunol.* 142:4105-4111
- 217.Shi L., Kam C-M., Powers J.C., Aebersold R., Greenberg A.H. 1992. Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J. Exp. Med.* 176:1521-1530
- 218.Shi L., Kraut R.P., Aebersold R., Greenberg A.H. 1992. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *J. Exp. Med.* 175:553-566
- 219.Shinkai Y., Takio K., Okumura K. 1988. Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). *Nature* 334:525-527
- 220.Shiver J.W., Su L., Henkart P.A. 1992. Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukemia cells expressing both cytolysin and granzyme A. *Cell* 71:315-322

221. Shubert W., Zimmerman K., Cramer M., Powitz S. 1989. Lymphocyte antigen Leu-19 as a molecular marker of regeneration in human skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:307-313
222. Siliciano R.F., Pratt J.C., Schmidt R.E., Ritz J., Reinherz E.L. 1985. Activation of cytolytic T lymphocyte and natural killer cell function through the T11 sheep erythrocyte binding protein. *Nature* 317:428-430
223. Smirnov D.V., Smirnova M.G., Korobko V.G., Frolova E.I. 1995. Tandem arrangement of human genes for interleukin-4 and interleukin-13: resemblance in their organization. *Gene*. 155:277-281
224. Smith M.J., Ortaldo J.R., Bere W., Yakita H., Okumura K.O., Young H.A. 1990. IL-2 and IL-6 synergize to augment the pore-forming protein gene expression and cytotoxic potential of human peripheral blood T cells. *J. Immunol.* 145:1159-1166
225. Smith M.J., Strobl S.L., Young H.A., Ortaldo J.R., Ochoa A.C. 1991. Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming gene expression in human peripheral blood CD8<sup>+</sup> lymphocytes. *J. Immunol.* 146:3289-3297
226. Spielman J., Lee R.K., Podack E.R. (u tisku). Single perforin allele prevents pancreatitis, female infertility and early death in Perforin/Fas ligand double deficit mice.
227. Stalder T., Hahn S., Erb P. 1994. Fas antigen is the major target molecule for CD4<sup>+</sup> T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 152(3): u127-1133.
228. Stellmach T, Ehrenstein H, Isenmann S, Müller C, Hengartner H, Kagi D. The role of perforin-expression by granular metrial gland cells in pregnancy. *Eur J Immunol.* 1995; 25:3342-3348.
229. Stewart C.L. 1994. Leukemia inhibitory factor and the regulation of pre-implantation development of the mammalian embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 39:233-238

- 230.Storkus W.J., Dawson J.R. 1991. Target structures involved in natural killing (NK): Characteristics, distribution and candidate structure. *CRC Crit. Rev. Immunol.* 10:393-398
- 231.Suda T., Takahashi T., Golstein P., Nagata S. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75:1169-1178.
- 232.Sunderland C.A., Naiem M., Mason D.Y., Redman C.W.R., Stirrat G.M. 1981. The expression of major histocompatibility antigens by human chorionic villi. *J. Reprod. Immunol.* 3:323-331
- 233.Sykes M., Harty M.W., Karlhofer F.M., Pearson D.A., Gregory S., Yokoyama W. 1993. Hematopoietic cells and radioresistant host elements influence natural killer cell differentiation. *J. Exp. Med.* 178:223-231
- 234.Szekeres-Bartho J., Kinsky R., Chaouat G. 1990. The effect of a progesterone-induced immunologic blocking factor on NK-mediated resorption. *Am. J. Reprod. Immunol.* 24:105-107.
- 235.Tabibzadeh S. 1990. Evidence of T cell activation and potential cytokine action in human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71:645-649
- 236.Takatsu K., Tominaga A., Harada N., Mita S., Matsumoto M., Takahashi T., Kikuchi Y., Yamaguchi N. 1988. T-cell replacing factor (TRF)/interleukin 5 (IL-5): molecular and functional properties. *Immunol. Reviews* 102:107-135
- 237.Tamada H., McMaster M.T., Flanders K.C., Anderws G.K., Dey S.K. 1990. Cell-type Specific Expression of Transforming Growth Factor-b 1 in the Mouse Uterus During the Preinplantation Period. *Mol. Endocrinol.* 4:965-972.
- 238.Thaler C.J., Critser J.K., McIntyre J.A., Faulk W.P., 1989. Seminal vesicles: A source of trophoblast lymphocytes cross-reactive antigen. *Fert. Steril.* 52, 3:463-468.

- 239.Thompson-Snipes L., Dhar V., Bond M.W., Mosmann T.R., Moore K.W., Rennick D. 1991. Interleukin-10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J. Exp. Med.* 173:507-510
- 240.Trapani J.A., Kwon B.S., Kozak C.A., Chintamaneni C., Young J.D.E, Dupont B. 1990. Genomic organization of the mouse pore-forming protein (perforin) gene and localization to chromosome 10. Similarities to and differences from C9. *J. Exp. Med.* 171:545-557
- 241.Trinchieri G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 47:187-195
- 242.Tschopp J., Schafer S., Masson D., Peitsch M.C., Heusser C. 1989. Phosphorylcholine acts as a Ca<sup>2+</sup>-dependent receptor molecule for lymphocyte perforin. *Nature* 337:272-274
- 243.Tutt M., Schuler W., Kuziel W.A., Tucker P.W., Bennet M., Bosma M.J., Kumar V. 1987. T cell receptor genes do not rearrange or express functional transcripts in natural killer cells of scid mice. *J. Immunol.* 138:2338-2344
- 244.Ulbrecht M., Rehberger B., Strobel I., Messer G., Kind B., Degitz K., Bieber T., Weiss E. 1994. HLA-G: expression in human keratinocytes in vitro and human skin *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* 24:176-181
- 245.Uyttenhove C., Simpson R.F., Van Snick J. 1988. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6934-6938
- 246.Vanderbeeken Y., Sarfati M., Bose R., Delespesse G. 1985. In utero immunization of the fetus to tetanus by maternal vaccination during pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 8:39-42
- 247.Vaux D.L., Aguilar H.L., Weissman I.L. 1992. Bcl-2 prevents death of factor-deprived cells but fails to prevent apoptosis in targets of cell mediated killing. *Int. Immunol.* 4:821-824.
- 248.Vignaus K., Golstein P. 1994. Fas-based lymphocyte-mediated cytotoxicity against syngeneic activated lymphocytes: a regulatory pathway. *Eur. J. Immunol.* 24:923-927.

249. Wainwright SD, Holems CH. Distribution of Fcγ receptors on trophoblast during human placental development: an immunohistochemical and immunoblotting study. *Immunology* 1993; 80:343-351.
250. Watanabe-Fukunaga R., Brannan C.I., Itoh N., Yonehara S., Copeland N.G., Jenkins N.A., Nagata S. 1992. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse fas antigen. *J. Immunol.* 148:1274.
251. Watanabe-Fukunaga R., Brannan C.I., Copeland N.G., Jenkins N.A., Nagata S. 1992. Lymphoproliferation disorders in mice explained by defect in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature.* 356:314-317.
252. Wegmann T.G. 1988. Maternal T cells promote placental trophoblast growth and prevent spontaneous abortion. *Immunol. Letters* 17:297-302
253. Wegmann T.G. 1991. Reproduction. *Current Opinion in Immunology* 3:759-761.
254. Wegmann T.G., Singh B., Carlson G.A. 1979. Allogeneic placenta is a paternal strain antigen immunoabsorbent. *J. Immunol.* 122:270-274
255. Wegmann T.G., Lin H., Guilbert T. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a T<sub>H</sub>2 phenomenon? *Immunol. Today* 14:353-356
256. Whiteside T.L., Herberman R.B., 1991. Characteristics of natural killer cells and lymphokine-activated killer cells. *Human Cancer Immunol.* 90:1-42.
257. Wilcox A.J. 1983. Surveillance of pregnancy loss in human populations. *Am. J. Indust. Med.* 4:285-291
258. Yagita H., Nakata M., Kawasaki A., Shinkai Z., Okumura K. 1992. Role of perforin in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Adv. in Immunol.* 51:215-242.
259. Yannelli J.R., Sullivan J.A., Mandell G.L., Enghelhard V.H. 1986. Reorientation and fusion of cytotoxic T lymphocyte granules after interaction with target cells as determined by high resolution cinemicrography. *J. Immunol.* 136:377-382

260. Yelavarthi K.K., Fishback J.L., Hunt J.S. 1991. Analysis of HLA-G mRNA in human placental and extraplacental membrane cells by in situ hybridization. *J. Immunol.* 156:2847-2854.
261. Yelavarthi K.K., Schmidt C.M., Ehlenfeldt R.G., Orr H.T., Hunt J.S. 1993. Cellular distribution of HLA-G mRNA in transgenic mouse placentas. *J. Immunol.* 151:3638-3644
262. Yelavarthi K.K., Chen H.I., Yang Y., Cowley B.D., Fishback J.L., Hunt J.S. 1991. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  mRNA and Protein in Rat Uterine and Placental Cells. *J. Immunol.* 146:3840-3848.
263. Yokota T., Otsuka T., Mosmann T., Banchereau J., DeFrance T., Blanchard D., DeVries J.E., Lee F., Arai K. 1986 Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell and T-cell-stimulating activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5894-5898
264. Yokoyama W.M. 1993. Recognition structures on natural killer cells. *Curr. Opin. Immunol.* 5:67-72
265. Young L.H., Peterson L.B., Wicker L.S., Persechini P.M., Young J.D.-E. 1989. In vivo expression of perforin by CD8<sup>+</sup> lymphocytes in autoimmune disease: Studies on spontaneous and adoptively transferred diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 143:3994-3999
266. Zheng L.M., Joag S.V., Ding J. 1991. Perforin-expressing granulated metrial gland cells in murine decidua. *J. Exp. Med.* Vol. 174:1221-1226.
267. Zheng L.M., Liu C.C., Ojcius D.M., Young J.D.E. 1991. Expression of lymphocyte perforin in the mouse uterus during pregnancy. *J. Cell. Sci.* 99:317-323

BYEUGLESNA KOUZNEVA  
R I 2 2 K 5

## ŽIVOTOPIS

Rodena sam 12.07.1963. u Drnišu. Osnovno i srednje obrazovanje završila sam u Rijeci. Po završetku srednješkolskog obrazovanja upisala sam se na studij Opće medicine u Rijeci šk. 1982/83. god. Tijekom studija bila sam demonstrator na Zavodu za fiziologiju i imunologiju. Diplomirala sam 1.02.1988. godine obranivši diplomski rad na Katedri za neurologiju pod nazivom "Multipla skleroza i trudnoća". Iste godine započela sam stažiranje u KBC Rijeka. Stručni ispit položila sam 1989. godine u Rijeci.

Od 1.03.1990. godine radila sam na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. Iste godine upisala sam poslijediplomski studij iz Opće kliničke patofiziologije. Magistarski rad pod nazivom "Zastupljenost i fenotipska obilježja perforin pozitivnih stanica u perifernoj krvi i decidui prvog tromjesečja trudnoće" obranila sam 1993. godine.

Tijekom proteklog razdoblja sudjelovala sam na više seminara i kongresa.

Od samog početka rada na Zavodu za fiziologiju i imunologiju aktivno sudjelujem i u projektima financiranim od strane Ministarstva znanosti Republike Hrvatske, i u programu farmaceutske kuće Pliva. Od 1995. godine sudjelujem u radu na zajedničkom projektu s grupom prof. P. Johnsonom iz Liverpoola.

Od 1.06.1995. radim kao asistent na Katedri za psihijatriju. Od 1.06.1996. godine nalazim se na specijalizaciji iz Psihijatrije u KBC Rijeka.