

# Regulacija citolitičke aktivnosti na spoju majčinih i fetalnih tkiva hormonsko-citokinskom mrežom

---

**Laškarin, Gordana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2002**

*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:188:320326>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-28**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Gordana Laškarin**

**REGULACIJA CITOLITIČKE AKTIVNOSTI  
NA SPOJU MAJČINIH I FETALNIH TKIVA  
HORMONSKO - CITOKINSKOM MREŽOM**

**Doktorska disertacija**

**Rijeka, 2002.**

## I AUTOR

---

Ime i prezime : Gordana Laškarin

Datum i mjesto rođenja.: 16. srpnja 1966. Rijeka

Završeni fakultet : Medicinski fakultet Rijeka, 1991.

Posdiplomski studij: Medicinski fakultet u Rijeci 1998

Sadašnje zaposlenje: asistent Medicinskog fakulteta u Rijeci

---

## II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA

---

Naslov rada: REGULACIJA CITOLITIČKE AKTIVNOSTI NA SPOJU MAJČINI  
I FETALNIH TKIVA HORMONSKO – CITOKINSKOM MREŽOM

Broj str. 201, sl. 30, tab. 5, bibliografskih podataka: 412

Ustanova ili mjesto gdje je disertacija izrađena: Medicinski fakultet u Rijeci i K B C  
Rijeka

Znanstveno područje: BIOMEDICINA I ZDRAVSTVO

Znanstveno polje: Temeljne medicinske znanosti

Znanstvena grana: imunologija i imunohematologija

Mentori: akademik Daniel Rukavina

Fakultet na kojem je obranjena: Medicinski fakultet Rijeka

---

## III OCJENA I OBRANA

---

Datum prijave teme: 4. rujna 2000.

Datum predaje rad: 11. rujna 2001.

Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen: 27. studenoga 2001.

Sastav Povjerenstva koje je rad ocijenilo

prof.dr.sc. Ljiljana Randić, prof.dr.sc. Asim Kurjak, akademik Dragan Dekaris i  
akademik Daniel Rukavina

Datum obrane : 11. siječnja 2002.

Sastav Povjerenstva pred kojim je rad obranjen: I s t i

---

**Mentor rada:** Akademik Daniel Rukavina

Doktorska disertacija je obranjena dana ..... na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

Rad ima 188 listova.

UDK klasifikacija:

Rad je u cijelosti izrađen na Zavodu za fiziologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta u Rijeci. Istraživanja su dio znanstveno-istraživačkog projekta broj 062001 “Ekspresija perforina u trudnoći” kojeg financira Ministarstvo znanosti i tehnologije Republike Hrvatske, a voditelj projekta je Akademik Daniel Rukavina.

Srdačno zahvaljujem svojem voditelju Akademiku Danielu Rukavini za svesrdnu potporu od početka mojeg rada na Zavodu za fiziologiju i imunologiju, te nesebičnu pomoć i podršku pri izradi ovog rada.

Hvala svim članovima grupe reproduktivne imunologije: Vlatki, Tatjani, Nataši, Kristijanu, Koraljki i Dorotei, laboranticama: Davorki, Nadiji, Jeleni i Kseniji, kao i ostalim djelatnicima Zavoda za fiziologiju i imunologiju na svakodnevnoj suradnji i podršci.

Zahvaljujem na suradnji prof. dr. sc. Ljiljani Randić i svom osoblju Odjela za planiranje obitelji Kliničkog bolničkog centra Rijeka.

Gordana Laškarin

## SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Istražiti utjecaj progesterona i njegova posrednika progesteronom induciranog blokirajućeg faktora (PIBF), te citokina IL-2, IL-10, IL-12 i IL-15 na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita (DL) *in vitro*, mogući mehanizam njihova djelovanja, te prisutnost i raspodjelu PIBF i IL-15 na majčino-fetalnom spoju.

**Materijal i metode:** Decidualno tkivo je dobiveno na Klinici za ginekologiju i porodništvo KBC-Rijeka, od žena koje su svojevrijem prekinule trudnoću od 6 do 10 tjedna gestacijske dobi. Decidualne mononuklearne stanice (DMS) su izdvojene enzimatskom razgradnjom tkiva i centrifugiranjem na gradijentu gustoće, te kultivirane u prisustvu progesterona, PIBF, IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, supernatanta decidualnih adherentnih stanica (DAC) ili kultivirane samo u mediju tijekom 18 ili 72 sata. DL, koji predstavljaju većinom CD3<sup>-</sup>CD56<sup>++</sup> NK stanice, izdvojili samo iz navedenih kultura kao neadherentnu frakciju i analizirali njihovu citolitičku aktivnost prema NK osjetljivoj K-562 staničnoj liniji u PKH-26 (red) dvosatnom testu citotoksičnosti uz očitavanje protočnim citometrom. Citolitička aktivnost DMS, koje sadržavaju DL i DAC, ispitivana je na isti način. Imunohistologiju, imunocitokemiju, imunofluorescenciju unutarstaničnih i površinskih biljega koristili smo za utvrđivanja PIBF<sup>+</sup>, IL-15<sup>+</sup>, perforin<sup>+</sup> i HLA-DR<sup>+</sup> stanica u suspenziji ili u smrznutom ili parafin uklopljenom decidualnom tkivu.

**Rezultati:** Svježe izdvojene DMS pokazuju nižu citolitičku aktivnost prema K-562 stanicama, nego nakon 18 sati kulture *in vitro*. DL kultivirani bez DAC tijekom 16 sati imaju nižu citolitičku aktivnost, nego DL odvojeni od DAC nakon dvosatne adherencije. DL izdvojeni iz suspenzije DMS nakon 18 sati kulture ubijaju oko 40% K-562 ciljnih stanica u omjeru 50:1 perforinskim mehanizmom. Progesteron i PIBF snizuju citolitičku aktivnost DL, na način da sprječavaju izlazak perforina iz stanica u dodiru s K-562 ciljevima. IL-15 i PIBF jesu obilno zastupljeni u decidui i svježe izdvojene decidualne CD56<sup>++</sup> NK stanice sadržavaju PIBF u citoplazmi. Interleukin-10, bitno ne mijenja, ali IL-2, IL-12 i IL-15 povećavaju citolitičku aktivnost DL. Progesteron i PIBF smanjuju udio IL-15<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> decidualnih makrofaga u suspenziji DMS. Stimulacija PIBF ne sprječava ushodnu regulaciju izražavanja perforina i citolitičku aktivnost DL u odgovoru na egzogeni IL-15 *in vitro*.

**Zaključak:** Kako decidua prvog trimestra sadrži PIBF i IL-15, moguće je da ravnoteža progesterona i IL-15 *in vivo* podržava sniženu citolitičku aktivnost perforinom bogatih DL.

**Ključne riječi:** Citolitička aktivnost; Decidualni limfociti; Decidualni makrofagi; Interleukin-15; Perforin; PIBF; Progesteron.



## S U M M A R Y

**Objectives:** We investigated the influence of progesterone, its mediator Progesterone Induced Blocking Factor (PIBF) and cytokines IL-2, IL-10, IL-12 and IL-15 on cytolytic activity of decidual lymphocytes (DL) *in vitro*, possible mechanisms of their action, as well as presence and distribution of PIBF and IL-15 at materno-fetal interface.

**Material and Methods:** Decidual tissue of artificially aborted 6-10 week old pregnancies were obtained at the Clinic of Gynaecology and Obstetrics, Clinical Hospital of Rijeka. Decidual mononuclear cells (DMC) were isolated by enzymatic digestion and density gradient centrifugation and cultured in the presence of progesterone, PIBF, IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, supernatant of decidual adherent cells (DAC) or in the medium only, during 18 hours or three days. DL, containing mostly CD3<sup>-</sup>CD56<sup>++</sup> NK cells, were separated from the cultures as nonadherent fraction and their cytolytic activity against NK sensitive K-562 cell line was analysed by PKH-26 (red) two hours cytotoxicity assay and flow cytometry. Cytolytic activity of DMC, containing DL and DAC, was investigated in the same manner. Immunohistology, immunocytochemistry, immunofluorescency of intracellular and surface antigens were used for detection of PIBF<sup>+</sup>, IL-15<sup>+</sup>, perforin<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>+</sup> cells in the suspension or in the frozen or paraffin embedded decidual tissue.

**Results:** Freshly isolated DMC showed lower cytolytic activity against K-562 cells than following 18 hours culture *in vitro*. DL cultured without DAC during 18 hours showed lower cytolytic activity, than DL separated from DAC following two hours adherence. DL separated from the suspension of DMC following 18 hours culture lyse about 40% K-562 targets in ratio 50:1 by perforin mechanism. Progesterone and PIBF decreased cytolytic activity of DL by blocking perforin release from the cell in the contact with K-562 targets. IL-15 and PIBF are present in decidua and freshly isolated decidual CD56<sup>++</sup> NK cells contain PIBF in their cytoplasm. Interleukin-10 does not change, while IL-2, IL-12 and IL-15 increase cytolytic activity of DL. Progesterone and PIBF decreased percentage of IL-15<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> decidual macrophages in the suspension of DMC. PIBF did not inhibit upregulation of perforin expression and cytolytic activity of DL following exogenous IL-15 stimulation *in vitro*.

**Conclusion:** As first trimester decidua contains PIBF and IL-15, it is possible that progesterone/PIBF and IL-15 balance supports decreased cytolytic activity of perforin rich DL *in vivo*.

**Key words:** Cytolytic activity; Decidual lymphocytes; Decidual macrophages; Interleukin-15; Perforin; PIBF; Progesterone.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD (PRIKAZ PODRUČJA)</b> .....	1
<b>1.1. Osnovni mehanizmi zaštite ploda od imunološkog odbacivanja</b> .....	2
<i>1.1.1. Specifičnosti izražavanja HLA- antigena i uloga trofoblasta</i> .....	3
<b>1.2. Stanice koje posreduju citotoksičnost</b> .....	4
<i>1.2.1. Citotoksični limfociti T</i> .....	4
1.2.1.1. Osobitosti decidualnih limfocita T.....	5
<i>1.2.2. NK stanice</i> .....	7
1.2.2.1. Fenotip decidualnih NK stanica .....	8
1.2.2.2. Citotoksičnost decidualnih NK stanica.....	10
<i>1.2.3. Monociti/makrofagi i druge izvršne stanice citotoksičnosti</i> .....	12
1.2.3.1. Osobitosti decidualnih makrofaga.....	12
<b>1.3. Molekularni mehanizmi stanicama posredovane citotoksičnosti</b> .....	13
<i>1.3.1. Perforinom posredovana citotoksičnost</i> .....	13
1.3.1.1. Zastupljenost perforina u decidualnom tkivu.....	14
<i>1.3.2. Citotoksičnost posredovana TNF i drugim članovima TNF glavne porodice bjelančevina</i> .....	15
1.3.2.1. Citotoksičnost posredovana Fas ligandom (FasL).....	15
1.3.2.2. Citotoksičnost posredovana čimbenikom nekroze tumora $\alpha$ (TNF $\alpha$ ).....	17
1.3.2.3. Citotoksičnost posredovana TWEAK .....	18
1.3.2.4. Citotoksičnost posredovana TRAIL.....	19
<b>1.4. Mehanizmi regulacije citotoksičnosti reproduktivnim hormonima</b> .....	22
<i>1.4.1. Progesteron</i> .....	23
1.4.1.1. Utjecaj progesterona na imunološki odgovor trudnice.....	23
1.4.1.2. Receptor za progesteron .....	26
<i>1.4.1.2.1. Građa receptora za progesteron</i> .....	26
<i>1.4.1.2.2. Prijenos signala putem receptora za progesteron</i> .....	27
<i>1.4.1.2.3. Raspodjela receptora za progesteron u limfocitima periferne krvi tijekom trudnoće</i> .....	28
<i>1.4.1.2.4. Dinamika izražavanja receptora za progesteron u limfocitima periferne krvi tijekom normalnih i patoloških trudnoća</i> .....	29

1.4.1.2.5. <i>Regulacija izražavanja receptora za progesteron</i> .....	30
1.4.1.3. Utjecaj antagonista progesterona na funkciju limfocita periferne krvi trudnica i ishod trudnoće .....	32
1.4.1.4. Otkrivanje i izdvajanje progesteronom induciranog blokirajućeg faktora (PIBF) .....	33
1.4.1.4.1. <i>Kretanje koncentracije progesteronom induciranog         blokirajućeg faktora (PIBF) u ljudskom serumu za vrijeme         normalnih i patoloških trudnoća</i> .....	34
1.4.1.5. Imunološki učinci progesteronom induciranog blokirajućeg faktora (PIBF) .....	35
1.4.1.5.1. <i>Mehanizam sniženja citotoksičnosti posredovan         progesteronom induciranim blokirajućim faktorom (PIBF)</i> ...	36
1.4.1.5.2. <i>Utjecaj progesteronom induciranog blokirajućeg faktora         (PIBF) na lučenje citokina</i> .....	38
<b>1.4.2. Imunomodulacijski učinci pojedinih citokina</b> .....	39
1.4.2.1. Interleukin-2 .....	39
1.4.2.1.1. <i>Otkriće i uloga interleukina-2</i> .....	39
1.4.2.1.2. <i>Građa receptora za interleukin-2 i prijenos signala</i> .....	40
1.4.2.1.3. <i>Utjecaj interleukina-2 na citotoksičnost limfocita         periferne krvi</i> .....	44
1.4.2.1.4. <i>Izražavanje interleukina-2 na materno-fetalnom spoju</i> .....	46
1.4.2.2. Interleukin-12 .....	48
1.4.2.2.1. <i>Struktura interleukina-12</i> .....	48
1.4.2.2.2. <i>Receptor za interleukin-12</i> .....	49
1.4.2.2.3. <i>Izvor i regulacija lučenja interleukina-12</i> .....	50
1.4.2.2.4. <i>Utjecaj interleukina-12 na citotoksičnost</i> .....	51
1.4.2.2.5. <i>Uloga i zastupljenost interleukina-12 na materno-fetalnom         spoju</i> .....	53
1.4.2.3. Interleukin-15 .....	53
1.4.2.3.1. <i>Osobitosti građe interleukina-15 i njegova receptora</i> .....	53
1.4.2.3.2. <i>Izvori i uloga interleukina-15</i> .....	55
1.4.2.3.3. <i>Izražavanje interleukina-15 i receptora za IL-15 na materno-         fetalnom spoju</i> .....	57
1.4.2.3.4. <i>Uloga interleukina-15 na materno-fetalnom spoju</i> .....	58

<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	60
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	63
<b>3.1. Materijal</b> .....	64
<b>3.1.1. Kemikalije</b> .....	64
<b>3.1.2. Mediji</b> .....	65
<b>3.1.3. Citokini</b> .....	67
<b>3.1.4. Hormon</b> .....	68
<b>3.1.5. Antitijela</b> .....	68
3.1.5.1. Antitijela korištena za imunocitokemijsko obilježavanje .....	68
3.1.5.1. Antitijela korištena za imunohistokemijsko obilježavanje .....	68
3.1.5.3. Antitijela korištena u direktnoj i indirektnoj imunofluorescenciji .....	69
3.1.5.4. Blokirajuća antitijela.....	69
<b>3.1.6. Laboratorijsko posuđe</b> .....	69
<b>3.1.7. Biološki materijal</b> .....	70
3.1.7.1. Decidualno tkivo .....	70
3.1.7.2. Stanična linija .....	70
<b>3.2. Metode</b> .....	70
<b>3.2.1. Enzimatska razgradnja decidualnog tkiva</b> .....	70
<b>3.2.2. Odvajanje decidualnih limfocita od decidualnih         adherentnih stanica</b> .....	71
<b>3.2.3. Stimulacija pune suspenzije decidualnih mononuklearnih         stanica in vitro</b> .....	72
<b>3.2.4. Stimulacija decidualnih limfocita</b> .....	72
<b>3.2.5. Priprema supernatanata decidualnih adherentnih stanica</b> .....	72
<b>3.2.6. Test citotoksičnosti</b> .....	73
3.2.6.1. Priprema ciljnih stanica za test citotoksičnosti .....	73
3.2.6.2. Priprema izvršnih stanica za test citotoksičnosti .....	74
3.2.6.3. Postavljanje izvršnih i ciljnih stanica u odgovarajuće odnose.....	74
<b>3.2.7. Metoda imunofluorescencije uz očitavanje protočnim citometrom</b> .....	75
3.2.7.1. Obilježavanje unutarstaničnog biljega – perforina metodom indirektno imunofluorescencije .....	75
3.2.7.2. Dvostruko obilježavanje unutarstaničnog biljega-IL-15	

indirektnom imunofluorescencijom i površinskog HLA-DR biljega direktnom imunofluorescencijom .....	76
<b>3.2.8. Dvostruko obilježavanje svježe izdvojenih decidualnih     limfocita metodom imunocitokemije .....</b>	<b>76</b>
<b>3.2.9. Imunohistologija decidualnog tkiva .....</b>	<b>78</b>
3.2.9.1. Imunohistologija decidualnog tkiva uklopljenog u parafin .....	78
3.2.9.1.1. Uklapanje decidualnog tkiva u parafin .....	78
3.2.9.1.2. Uklanjanje parafina iz rezova decidualnog tkiva .....	78
3.2.9.1.3. Postupak otkrivanja antigena uz pomoć mikrovalne pećnice .....	79
3.2.9.1.4. Obilježavanje antigena .....	79
3.2.9.2. Imunohistologija smrznutih rezova .....	80
<b>3.3. Statiistička analiza .....</b>	<b>80</b>
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>81</b>
<b>4.1. Učinak procesa izdvajanja decidualnih adherentnih stanica i     njihovih topljivih čimbenika na citolitičku aktivnost     decidualnih limfocita .....</b>	<b>82</b>
<b>4.2. Utjecaj interleukina-2, interleukina-12 i interleukina-10 na     citolitičku aktivnost decidualnih limfocita .....</b>	<b>87</b>
<b>4.3. Učinak progesterona na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita .....</b>	<b>91</b>
<b>4.4. Učinak progesteronom induciranog blokirajućeg faktora (PIBF)     na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita .....</b>	<b>97</b>
<b>4.5. Prisutnost i raspodjela progesteronom induciranog blokirajućeg faktora     (PIBF) i interleukina-15 u decidualnom tkivu prvog trimestra     normalne humane trudnoće .....</b>	<b>104</b>
<b>4.6. Učinci interleukina-15 na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita i     međudjelovanje interleukina-15 i progesterona .....</b>	<b>112</b>
<b>4.7. Učinak progesterona i progesteronom induciranog blokirajućeg faktora     (PIBF) na regulaciju izražavanja interleukina-15 u decidualnim     adherentnim stanicama .....</b>	<b>119</b>
<b>4.8. Utjecaj progesteronom induciranog blokirajućeg faktora (PIBF)     na izražavanje perforina u decidualnim limfocitima stimuliranim     interleukinom-15 .....</b>	<b>125</b>

<b>5. RASPRAVA</b> .....	129
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	150
<b>7. LITERATURA</b> .....	153
<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	184

# 1. UVOD (PRIKAZ PODRUČJA)



### 1.1. Osnovni mehanizmi zaštite ploda od imunološkog odbacivanja

Razvojem vivipariteta u kralješnjaka izrasli su mnogi imunološki i endokrinološki problemi, koji začuđuju reproduktivne biologe i imunologe već mnogo godina (1). Stanice trofoblasta, koje su fetalnog porijekla, pa nasljeđuju i očeve antigene, koji su barem djelomice nepoznati majci, prodiru u decidualiziranu sluznicu maternice tijekom implantacije. Štoviše, ulaze i u cirkulaciju majke tijekom čitave trudnoće (2). Međutim, imunokompetentne stanice majke, obilno zastupljene u decidui, u pravilu ne pokreću imunološku reakciju odbacivanja aloantigenog tkiva trofoblasta s kojim su u neposrednom dodiru (3). Mehanizmi koji zaštićuju fetus od potencijalno smrtonosnog majčinog imunološkog odgovora nisu do danas još uvijek dovoljno poznati.

Jedna od teorija, koja nastoji objasniti preživljavanje fetusa kao presadka je osnovana na pretpostavci da majčine imunokompetentne stanice u sluznici maternice ne prepoznaju antigene fetalnog porijekla. Vjerovalo se da su majčini decidualni limfociti nezreli i ne mogu prepoznati strane antigene. Međutim, Chaouat (4) je izolirao iz embrionalnog tkiva u resorpciji citotoksične limfocite T usmjerene protiv stanica koje izražavaju HLA antigene naslijeđene od oca. Općenito embrio u procesu odbacivanja, iz bilo kojeg razloga, postaje infiltriran majčinim mononuklearnim stanicama, što upućuje da majka može imunološki prepoznati i odbaciti plod u slučaju potrebe. Nadalje, zametak ne treba genetsku podršku majke da bi se uspješno implantirao u endokrinološki pripremljen endometrium i uspješno preživio do poroda. Oplođeno jajašce angora zeca može se normalno razvijati, ako se presadi u jajovode ženke zeca vrste belgijskog orijaša, koja je nedavno oplođena mužjakom iste vrste (5). Trudnoća uspješno napreduje i u umjetno oplođenih zečica, koje su prethodno imunizirane protiv tkivnih antigena obaju roditelja prenesene zigote (3). Unutar ljudske vrste proces oplodnje nije osobito učinkovit i procjenjuje se da 43-78% oplođenih jajnih stanica propadne (6). To se dogodi u razdoblju između prvog i dvadesetog dana po oplodnji (6), kada klinički trudnoća još nije ni prepoznata. Stoga je razloge ranih propadanja ploda teško precizno utvrditi, iako se može govoriti o ulozi imunoloških mehanizmima u odbacivanju ploda. Predložene su dvije osnovne skupine mehanizama koje zaštićuju plod od majčina odbacivanja, a to su: a) osobitosti lokalnog imunološkog sustava majke u maternici, na spoju majčinih i fetalnih tkiva, i b) specifičnosti izražavanja različitih gena na tkivu fetalnog porijekla, osobito gena glavnog sustava tkivne srodnosti ili HLA (od

eng. Human Leucocytes Antigens), koji imaju važnu ulogu u imunološkom prepoznavanju i odbacivanju alotransplantata.

### ***1.1.1. Specifičnosti izražavanja HLA antigena i uloga trofoblasta***

Trofoblast je jedina stanična populacija fetalnog porijekla koja raste i diferencira se u izravnom dodiru s majčinih tkivima. Mononuklearni citotrofoblast gradi prvi sloj resica posteljice i u dodiru s majčinom krvlju diferencira se u vanjski sloj stopljenih stanica s puno jezgara- sinciciotrofoblast. Dio stanica citotrofoblata diferencira se i odvaja od resica tzv. ekstravilozni citotrofoblast i infiltrira duboko u majčinu decíduu u prvom trimestru trudnoće. Time pokazuje neka od svojstava tumorskih stanica (7,8). Regulirano izražavanje HLA gena na stanicama trofoblata predstavlja ključni čimbenik koji dozvoljava nesmetani rast trofoblata i sprječava odbacivanje fetusa od strane majke. Različite populacije trofoblastnih stanica međusobno se razlikuju prema različitim razinama prepisivanja i prevođenja gena HLA razreda I. Općenito trofoblast prvog tromjesečja prepisuje više glasničke RNA za antigene HLA razreda I i sadrži više bjelančevina HLA razreda I (9), nego trofoblastne stanice na terminu poroda, iako je donedavno bilo prihvaćeno mišljenje da stanice trofoblata ni na jednom stupnju diferencijacije nemaju izražene membranske klasične HLA molekule u niti jednoj fazi trudnoće. King i suradnici (10) su dokazali metodom imunofluorescencije membransku HLA-C molekulu na stanicama ekstraviloznog citotrofoblata prve trećine trudnoće. Od neklasičnih HLA antigena razreda I u ljudskoj posteljici su utvrđene četiri membranske i dvije topljive izoforme HLA-G molekule i HLA-E molekula, koja je neophodna za izražavanje HLA-G molekule na membrani stanica (11). Glasnička RNA za HLA-G otkrivena je u ekstraviloznom i viloznom citotrofoblastu prvog tromjesečja trudnoće, terminskim amnionskim stanicama i mezenhimskim stanicama unutar resica. Ekstravilozni trofoblast uvijek najsnažnije izražava glasničku RNA za HLA-G, međutim u viloznom sinciciotrofoblastu nema glasničke RNA za HLA-G (12). Ovako složen model izražavanja HLA antigena razreda I, uz potpunu odsutnost HLA antigena razreda II na trofoblastu, odražava njihovu zahtijevnu imunološku funkciju. NK stanice liziraju ciljane stanice koje ne izražavaju molekule HLA razreda I na svojoj površini. Međutim, HLA-G molekula (u odsustvu klasičnih molekula razreda I) može činiti trofoblastne stanice otpornim na NK stanično ubijanje. To dokazuje nalaz CD94 molekule

na gotovo svim svježe izoliranim decidualnim NK stanicama, koje u citoplazmi posjeduju brojna zrnca ispunjena citolitičkim medijatorom – perforinom (13). Naime, CD94 molekula udružena s NKG2A prepoznaje HLA-C, te HLA-E i HLA-G antigen izražen na stanicama ekstraviloznog trofoblasta i tako doprinosi inhibiciji lize (14). Nadalje, topljive izoforme HLA-G bjelančevine potiskuju citotoksičnost majčinih limfocita T na način da se vežu direktno na T stanični receptor ili na CD8 molekulu i tako uklone interakciju između T limfocita i HLA antigena razreda I na ciljnim stanicama (15). Nedostatak izražavanja većine klasičnih polimorfnih HLA antigena razreda I na stanicama trofoblasta bi trebao ometati lizu posredovanu citotoksičkim limfocitima T i činiti fetalno-tkivnu površinu otpornom na stečeni imunitet posredovan limfocitima T (15). Prema sveukupnim današnjim spoznajama, uspješna trudnoća je rezultat vrlo složenih odnosa između stanica majčina i fetalnog porijekla, koje dolaze u izravan dodir u feto-placentnoj jedinici, te niza tvari izlučenih lokalno u visokim koncentracijama (hormoni, citokini i drugi proteinski modulatori), koji pojedinačno ili u međusobnim interakcijama reguliraju njihovu funkciju.

## **1.2. Stanice koje posreduju citotoksičnost**

### **1.2.1. Citotoksički limfociti T**

Citotoksički limfociti T su dio sistema stečene imunosti, a njihova aktivacija zahtijeva interakciju TCR/CD3 kompleksa s prerađenim antigenom (najčešće bjelančevinom) udruženim s HLA molekulom na antigen predočnim stanicama (APS) (16). Međudjelovanje je visoko specifično, ali obično niskog afiniteta. Pojačavaju je kostimulacijske molekule CD4 odnosno CD8, koje izražene na membrani limfocita prepoznaju HLA molekule razreda II odnosno I na predočnoj (APS) ili na ciljnoj stanici (17). Za potpunu aktivaciju limfocita T (proliferaciju, citokinsku produkciju i citotoksičnost) potrebni su kostimulacijski signali koji se ostvaruju kontaktom CD2 molekule (izražene na limfocitima) i CD58 molekule (LFA-3) (izražene na APS) (17). Ukoliko se blokira CD2 molekula monoklonskim antitijelom i tako spriječi njena aktivacija ligandom, spriječit će se i njena kostimulacija, te potisnuti mnogi vidovi stanične imunosti (16). Posebnu ulogu u aktivaciji T limfocita ima kontakt CD28 molekule i njenog B7 (B7-1 ili B7-2 ili B7-3) liganda na APS. Vezanjem preko TCR i CD28 molekule na T limfocitima

povećava se izražavanje CTLA-4 molekule, koja je alternativni ligand za B7 molekule s većim afinitetom od CD28 molekule. Kostimulacija putem CD28/CTLA-4 molekule dovodi do snažne produkcije IL-2 i proliferacije limfocita T periferne krvi, a njihovom blokadom dolazi do snažne inhibicije T limfocitnog odgovora. Reakcije vezivanja na staničnoj membrani prati unutarstanični prijenos signala, putem kompleksa CD3 molekule. Promjena konformacije zeta lanca CD3 kompleksa, odvija se pod utjecajem aktivacije CD2, CD28, TCR/CD4 ili TCR/CD8 receptora (17,18) i aktivira nekoliko signalnih puteva. Posredstvom G proteina i aktivacijom fosfolipaze C razgrađuje se membranski fosfatidil inozitol difosfat (PIP2) na dvije komponente: inozitol trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG). IP3 oslobađa endogeni  $Ca^{++}$  iz endoplazmatskog retikuluma, a zatim taj slobodni  $Ca^{++}$  kao drugi glasnik dovodi do ulaska izvanstaničnog  $Ca^{++}$  u stanicu. DAG ima dvije potencijalno signalirajuće uloge. Jedna je da aktivira protein kinazu C (PKC) i time potiče fosforilacije serina i treonina na proteinima važnim za izvršne funkcije stanice, a druga je da se sam razgradi do arahidonske kiseline, koja ciklooksigenaznim ili lipooksigenaznim putem daje prostaglandine, odnosno leukotrijene. Prostaglandini i leukotrijeni utječu na izvršne funkcije npr. citotoksičnost stanica (19).

#### 1.2.1.1. Osobitosti decidualnih limfocita T

U suspenziji decidualnih leukocita dobivenih nježnim mehaničkim izdvajanjem iz tkiva, bez tripsinske razgradnje, utvrđen je imunofluorescentnim obilježavanjem uz analizu protočnim citoimetrom veliki udio limfocita T (50-60%  $CD3^+$  stanica) (20). Ti rezultati su u skladu sa očekivanim udjelom T limfocita, na temelju rezultata imunohistoloških studija (20), ali u suprotnosti s udjelom T limfocita (svega oko 10%) dobivenim nakon enzimatske razgradnje tkiva (13). Razlog tome može biti denaturacija CD3 molekule ili smrt manje vitalnih  $CD3^+$  stanica. Općenito se smatra da je TCR/CD3 kompleks na decidualnim stanicama nishodno reguliran, te slabo ili uopće ne odgovara na aloantigensku ili anti-CD3 stimulaciju. U prilog tome govori mala površinska gustoća TCR/CD3 kompleksa na decidualnim limfocitima odmah po izolaciji iz tkiva, koja se *in vitro* može povećati stimulacijom s PMA i ionomicinom (21). Minceva-Nilson i suradnici (20) govore o povećanom udjelu limfocita T, koji izražavaju  $\gamma/\delta$  heterodimer T staničnog receptora u decidui, a koji prema njihovim istraživanjima iznosi od 27%-40%, za razliku od periferne

krvi trudnice, gdje su TCR  $\gamma/\delta^+$  stanice zastupljene u svega nekoliko postotaka. Stanice koje izražavaju  $\gamma/\delta$  heterodimer T staničnog receptora predstavljaju heterogenu populaciju s citotoksičkim i sekretornim funkcijama (22,23). Istraživanja o načinu prepoznavanja antigena pokazuju da  $\gamma/\delta^+$  stanice dvojako prepoznaju antigen (24). Sam neprerađen ili prerađen i prezentiran u sklopu molekula HLA sustava (24,25). Mogući razlog za to je u strukturi  $\gamma/\delta$  heterodimera, koji gradom podsjeća na antitijela ( $\delta$  dulji heterogeni i  $\gamma$ -kraći homogeni lanac). Sukladno ovim spoznajama, moguća funkcija decidualnih  $\gamma/\delta$  stanica bila bi prepoznavanje trofoblastnih antigena u kontekstu HLA-G, nekласične HLA molekule razreda I (25,26) i tako ograničavanje prekomjernog trofoblastnog rasta. Limfociti T bi mogli imati ulogu u implantaciji, jer je njihov udio veći na mjestu implantacije (27). Međutim, relativan udio limfocita T se značajno smanjuje u decidui prvog tromjesečja i stoga izgleda ove stanice nemaju veću ulogu u održavanju trudnoće (27).

Gotovo svi decidualni T limfociti izražavaju stanične biljege CD2, CD5 i CD7 (21). U nakupinama leukocita na imunohistološkim preparatima utvrđena je gotovo jednaka učestalost CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> stanica (21), ali je mnogo više CD8<sup>+</sup> stanica razasuto u stromi. Osim toga, CD8 molekulu pored T limfocita izražavaju i decidualne NK stanice, pa je omjer CD4/CD8 u decidui obrnut od onog u perifernoj krvi, gdje prevladavaju CD4<sup>+</sup> stanice (0,7 naspram 1,2-2,0) (20,28).

Analizom protočnim citometrom, na temelju intenziteta fluorescencije za CD8 antigen, sve CD8<sup>+</sup> stanice mogu se podijeliti u dvije stanične subpopulacije: populacija koja snažno izražava CD8 molekulu (bright<sup>+</sup>) istovremeno je CD3<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup> P<sup>-</sup>, za razliku od druge subpopulacije koja manje izražava CD8 molekulu (dim<sup>+</sup>), a ujedno je CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup>, i pripada u stvari decidualnim NK stanicama (13). Naime, u decidui gotovo da i nema fenotipski klasičnih citotoksičnih limfocita T (CD8<sup>bright+</sup>P<sup>+</sup>) (13), stoga bi CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> limfociti mogli pripadati imunosupresijskim stanicama. Decidualni limfociti T potiču rast posteljice i sprječavaju spontane pobačaje (29). Dokazano je da luče čimbenik stimulacije rasta granulocitnih i makrofagnih kolonija (GM-CSF, eng. Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor) i transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (TGF $\beta$ , eng. Transforming Growth Factor  $\beta$ ) (30,31).

### 1.2.2. NK stanice

NK stanice predstavljaju sustav prirodne imunosti. Njihova se funkcija dugo smatrala neovisnim o HLA sustavu, na temelju činjenice da one uspješno liziraju tumorske stanice, koje ne izražavaju HLA antigene (npr. K-562 staničnu liniju eritroleukemije) (32).

Međutim, NK stanice predstavljaju prvu liniju obrane protiv virusima inficiranih singeničnih stanica, koje na svojoj membrani potiskuju izražavanje molekula HLA razreda I. Stoga se zaključilo da nedostatak odgovarajućih HLA molekula razreda I na ciljnim stanicama provodi u NK stanicu signal za lizu (33). Istovremeno NK stanice izražavaju receptore koji posreduju aktivaciju NK stanica i lizu osjetljivih stanica što dovodi do klasične HLA-nerestriktivne lize. Stoga receptore na NK stanicama možemo podijeliti na dvije grupe:

1. receptori koji potiču aktivaciju NK stanica/NKTRs (od eng. NK Cells Triggering Receptors);
2. receptori koji provode negativni signal u NK stanicu i potiskuju citolitičku aktivnost, npr. KIR (od eng. Killer Inhibitory Receptors) (34).

U ljudi je poznato nekoliko molekula koje potiču aktivaciju NK stanice: CD2, CD16, LFA-1, CD26, CD27, CD28 i CD44 (34), a novije studije otkrile su obitelj aktivacijskih membranskih bjelančevina tipa II, nazvanih CD161 u ljudi, a NKR-P1 u miša i štakora (34). Homologe su članovima glavne porodice lektina C. Geni koji kodiraju CD161 receptor nalaze se u čovjeka na 12. kromosomu u regiji nazvanoj NKC (od eng. Natural Killer Cell Complex). CD161, *in vitro*, prepoznaje oligosaharidne ligande na ciljnoj stanici i uvjetuje citotoksičnu aktivnost. Njegovim specifičnim blokiranjem ne može se spriječiti liza nezaštićene ciljne stanice, a CD161 može sudjelovati i u inhibiciji lize (34).

Grupa gena koja kodira receptore za provođenje negativnog signala u NK stanicu predstavljena je tzv. KIR receptorima (od eng. Killer Inhibitory Receptors), kao mogućim receptorima za HLA molekule razreda I na humanim stanicama (35). Pripadaju porodici imunoglobulina, a nalaze se na 19. kromosomu. KIR-2d ili p58 receptor sadrži dvije izvanstanične domene i uključen je u prepoznavanje HLA-C haplotipa, a KIR-3D ili p70 receptor sadrži tri izvanstanične domene i uključen je u prepoznavanje HLA-B haplotipa. Dokazana je i KIR bjelančevina p140 za prepoznavanje HLA-A haplotipa (35). Na membrani NK stanice nazočne su i druge molekule koje provode negativni signal za lizu.

Membranski glikoprotein (gp) CD94, koji po svojoj strukturi odgovara p58 molekuli, ali pripada glavnoj porodici membranskih bjelančevina tipa II i sličan je lektinima C tipa, uključen je u prepoznavanje HLA-A, HLA-B, HLA-C i HLA-E haplotipa (36). U regiji NKC pronađeni su i geni NKG2A-E koji kodiraju glikoproteine, čije je svojstvo da stvaraju disulfidne heterodimere s glikoproteinom CD94 i provode također inhibicijski signal prepoznavanjem HLA-A, HLA-B i HLA-C haplotipa i neklasične HLA-G1 i HLA-E molekule (37). Svi membranski receptori s inhibicijskim funkcijama imaju jedinstven slijed aminokiselina tzv. ITIM (od eng. Immunereceptor Tyrozine-based Inhibitory Motif) za provođenje signala u stanicu (34). Vezanje liganda (HLA molekule) na KIR receptor uzrokuje fosforilaciju tirozina u ITIM slijedu. Fosforilirani ITIM aktivira (fosforilira) tirozin fosfataze, koje posjeduju SH2 domenu i prosljeđuje signal za inhibiciju lize u NK stanicu (34). Uloga inhibicijskog puta signaliranja je zaustaviti pozitivne signale za lizu koji se provode aktivacijskim receptorima (34).

#### 1.2.2.1. Fenotip decidualnih NK stanica

Weill je prvi uočio, već 1920. godine, leukocite s obilnim acidofilnim i metakromatskim zrnima, u decidui prvog mjeseca humane trudnoće (8). Danas su te stanice u ljudi nazvane veliki granulirani endometrijalni/decidualni limfociti ili LGL (od eng. Large Granular Lymphocytes), a pripadaju NK staničnoj liniji (38). U glodavaca je utvrđena slična populacija stanica, koje se počinju diferencirati u decidui za vrijeme implantacije, a vrhunac dosižu 12-14 dana gestacije. Nazvane su zrnate stanice metrijalne žlijezde ili GMG stanice (od eng. Granulated Metrial Gland Cells) (39). Elektronskom mikroskopijom utvrdila se veličina humanih velikih zrnatih limfocita od 12-17  $\mu\text{m}$ , nepravilan oblik i ekscentrično smještena jezgra. Stanična površina decidualnih NK stanica oblikuje brojne mikroresice i debelo-razgranate nastavke prema susjednim limfocitima, epitelnim i stromalnim stanicama (20). U citoplazmi sadrže brojna okrugla zrnca (veličine 250-700 nm), različite elektronske gustoće. Većina zrnaca je vezana za unutarnju stranu plazmatske membrane, ali i smještena slobodno u citoplazmi (40). Zrnca sadrže brojne molekule citolitičkog medijatora perforina i serinske esteraze (41), za koje se smatra da predstavljaju prve citolitičke medijatore koji se pojavljuju tijekom diferencijacije NK stanica (42). Sinteza bjelančevine perforina u decidualnim NK stanicama ovisi o enzimu sintetaza

nitričnog oksida-2 (43). Naime, imunohistologijskim obilježavanjem perforina u decidui miša kojemu nedostaje gen za sintetazu dušikova oksida-2 uvidio se značajno manji broj perforin pozitivnih NK stanica u okolini žlijezda i bazalnoj decidui 8, 10 i 12 dana trudnoće (43). Elektonskim mikroskopom je otkrivena malobrojna populacija sitnijih stanica, bez zrnaca, koja se također obilježava antitijelima anti-CD45, anti-CD56 i anti-CD94 molekule (20).

Decidualne NK stanice prevladavaju u decidui i čine 70% decidualnih leukocita prvog tromjesečja trudnoće (44). Na terminu poroda njihov broj se značajno smanjuje (41). Prisutne su također u endometriju žene koja nije trudna, gdje proliferiraju tijekom sekrecijske faze menstruacijskog ciklusa (45). One potiču apoptozu žljezdanog epitela endometrija lučenjem perforina i serinskih esteraza iz svojih citoplazmatskih zrnaca i pokreću menstruaciju (46,47). U tome i same umiru apoptozom, ako ne nastupi trudnoća, što dokazuje njihovu ovisnost o decidualizaciji stromalnih stanica i hormonima trudnoće (45,48). *In vitro* proliferiraju kultivirani s decidualnim stromalnim stanicama i suboptimalnim koncentracijama IL-2 (49). To može biti posljedica direktnog dodira sa stromalnim stanicama, jer decidualne NK stanice ne mogu proliferirati u mediju sa suboptimalnim koncentracijama IL-2, ako su odvojene od stromalnih stanica propusnom membranom (49). Mikrookoliš decidue, s obiljem IL-15 izgleda ima snažan utjecaj na preživljavanje i proliferaciju decidualnih NK stanica (49). Kammerer i suradnici (50) su imunofluorescencijom utvrdili da 7%-23,5% decidualnih NK stanica izražava biljeg svojstven stanicama u proliferaciji Ki 67. Taj podatak odgovara analizi nuklearnih faza protočnim citometrom, koja je utvrdila 6%-22% decidualnih NK stanica u fazama S+G(2)+M (50).

Iako decidualne NK stanice pripadaju NK staničnoj liniji (38), postoje i brojne razlike između decidualnih LGL i NK stanica periferne krvi. Decidualni LGL ne izražavaju membransku CD3 molekulu, ali su proteinski zeta i epsilon lanci CD3 molekulskog kompleksa utvrđeni u citoplazmi 90% klonova CD3<sup>-</sup> decidualnih limfocita (51). CD56 molekula, koja pokazuje visoku homologiju s NCAM molekulom (od eng. Neural Cell Adhesion Molecule), izražena je na membrani većine decidualnih NK stanica čak u pet puta većoj količini, nego na CD56<sup>bright+</sup> NK stanicama periferne krvi, koje inače čine svega 10% NK populacije (101). Ostale NK stanice periferne krvi su CD56<sup>dim+</sup> (52). Decidualne



NK stanice samo iznimno (2%) izražavaju receptor za IgG niskog afiniteta (FcγR III ili CD16 molekulu), dok je na periferiji 77% CD56<sup>+</sup> stanica CD16<sup>bright+</sup> (13,52). Ne izražavaju ni CD57 biljeg, svojstven za NK staničnu liniju. Stoga decidualni LGL predstavljaju autentične stanice decidue, CD3<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD56<sup>bright+</sup> CD57<sup>-</sup> fenotipa (13,44,48,52). Gotovo sve su CD2 i CD7 pozitivne (21). Decidualne stanice izražavaju aktivacijske biljege CD69 i HLA-DR i to u većem postotku tijekom proliferacijske faze endometrijskog ciklusa (53). Izražavanje navedenih aktivacijskih biljega nishodno se regulira u sekrecijskoj fazi ciklusa i ranoj trudnoći (53).

#### 1.2.2.2. Citotoksičnost decidualnih NK stanica

Pored fenotipskih obilježja decidualni limfociti su osebujni i po svojoj citolitičkoj aktivnosti. Iako je 90% decidualnih limfocita perforin pozitivno (13) s velikim brojem perforinskih molekula u stanici, decidualni limfociti (LGL i limfociti T) *in vivo* ili svježe izolirani *in vitro* ne ubijaju stanice ekstraviloznog trofoblasta (54). Međutim, *in vitro* stimulirane s IL-2 postaju citotoksične i liziraju trofoblast učinkovitošću LAK stanica, kao i JEG-3 koriokarcinomsku staničnu liniju (55).

Na decidualnim stanicama utvrđene su funkcijske molekule za prepoznavanje HLA-antigena razreda I i inhibiciju citotoksičnosti (14,34,51). CD94 (Kp43) izražava se na 31% decidualnih klonova, a p58.2 molekula koju prepoznaje HP3E4 monoklonsko antitijelo u 14% (51). Međutim, sve svježe izolirane NK stanice decidue su CD94<sup>bright+</sup> (14). CD94 molekula udružena s NKG2A na decidualnim NK stanicama (56), prepoznaje HLA-C, HLA-G i HLA-E antigen izražen na stanicama ekstraviloznog citotrofoblasta, i provodi inhibicijski signal u stanicu, te moguće *in vivo* doprinosi očuvanju trudnoće (14,15,56,57,58). S druge strane CD94 molekula udružena s NKG2C može biti aktivacijski receptor za HLA-G (15) i HLA-E (57). Duchler i suradnici (59) su pokazali da je NKG2C receptor na NK stanicama uključen u prepoznavanje K-562 stanica. Ista grupa istraživača nije otkrila ligand za NKG2C receptor na K-562 stanicama, ali je uočila gubitak liganda za vrijeme diferencijacije K-562 stanica uslijed stimulacije s phorbol-myristate acetatom i ionomicnom, što je dovelo do gubitka osjetljivosti K-562 stanica na lizu posredovanu NK stanicama (59). *In vitro* pročišćene decidualne CD56<sup>+</sup> NK stanice prvog tromjesečja normalne trudnoće nakon kratkog inkubiranja pokazuju jednaku citotoksičnost (31,2%)

prema NK osjetljivoj K-562 staničnoj liniji kao pročišćene NK stanice periferne krvi (33,5%) (60). Citotoksičnost je posredovana perforinom, jer je perforin zaslužan za 98% smrti K-562 stanica (61). U ovom pokusu NK stanice su od ostalih populacija limfocita odijeljene na temelju izražavanja CD56 molekule, ali ne i CD16 molekule, te predstavljaju još uvijek nejedinstvenu NK staničnu populaciju koja sadrži CD16<sup>-</sup> i CD16<sup>+</sup> stanice. U perifernoj krvi i decidui udio CD16<sup>-</sup> i CD16<sup>+</sup> stanica je različit. CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK stanice čine 90% NK stanica periferne krvi zdravih osoba koje nisu trudne i pokazuju visoku citotoksičnost, a njihov udio se statistički značajno smanjuje tijekom trudnoće (62). Zabilježene su slične promjene u citolitičkoj aktivnosti miša tijekom trudnoće (63). Suprotno tome udio manje citotoksičnih CD16<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK stanica se povećava u perifernoj krvi trudnice, što podsjeća na zbivanja u majčino-fetalnoj jedinici. Naime, decidualne NK stanice samo iznimno (2%) izražavaju CD16 molekulu (13). Stoga iz navedenih pokusa nije bilo jasno da li su jednake citolitičke aktivnosti decidualnih NK stanica i NK stanica periferne krvi postignute povećanjem udjela CD16<sup>-</sup> stanica u decidui i smanjenjem udjela CD16<sup>+</sup> stanica u perifernoj krvi tijekom trudnoće. Kasnije su King i suradnici (32) pokazali da mala subpopulacija CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> decidualnih stanica ima podjednaku citotoksičnost, poput većine NK stanica periferne krvi, tako da bi jednaka citolitička aktivnost decidualnih NK stanica i stanica periferne krvi mogla biti posljedica različite zastupljenosti CD16<sup>+</sup> stanica. U prilog tome govore i rezultati Christmase i suradnika (64) koji su utvrdili nisku citotoksičnost CD3<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD56<sup>bright+</sup> decidualnih klonova protiv NK i LAK ciljnih stanica. Zanimljivo je da aktivnost decidualnih CD56<sup>+</sup> NK stanica neposredno nakon izolacije bitno niža (srednja vrijednost 36,6%) od NK aktivnosti periferne krvi (50,4%) prema K-562 stanicama, što se kultivacijom preko noći *in vitro* izjednačava (60). Zaključuje se da je citolitička funkcija većine decidualnih leukocita potisnuta brojnim tvarima koje se luče u decidui, a do danas su tek djelomično istražene, kao i mehanizmi njihova djelovanja. Niz tvari, stvaranih lokalno, mogao bi biti odgovoran za imunosupresiju, među kojima je npr. TGF- $\beta$  utvrđen u nadtalogu 24-48 satne kulture decidualnih NK stanica (30). Nadalje, u tu skupinu tvari ubrajaju se IL-4, progesteron, prostaglandini, te specifična citokinska mreža decidualnog miljea (65,66). Kratkotrajno kultiviranje može biti udruženo s *in vitro* stvaranjem IL-2 ili IFN $\gamma$ , koji aktiviraju NK stanice (60). Osim toga izlaganje enzimima tijekom izolacije decidualnih limfocita može eventualno oštetiti membranske NK

receptore. Na to upućuje smanjena citotoksičnost NK stanica periferne krvi, koje su izložene tripsinu, ali ne i kolagenazama (32).

### 1.2.3. Monociti/makrofagi i druge izvršne stanice citotoksičnosti

Otkrivanjem molekularne osnove citotoksičnosti otkrivaju se medijatori za citolitički učinak i u staničnim populacijama koje ne pripadaju u klasične izvršne stanice citotoksičnosti (CD8<sup>+</sup> limfocite T ili NK stanice). Citotoksičnost monocita/makrofaga pripisuje se TNF $\alpha$  (67) i novootkrivenom smrtonosnom ligandu TWEAK (68). TWEAK je izražen na većini tjelesnih stanica glodavaca, stoga se nameće zaključak da sve tjelesne stanice u datim okolnostima mogu posredovati smrt ciljnih stanica, koje izražavaju receptor za TWEAK nazvan DR3 (od eng. Death receptor 3). Za sada još nema podataka o raspodjeli TWEAK receptora u ljudi.

#### 1.2.3.1. Osobitosti decidualnih makrofaga

Imunofenotipizacijom stanica izdvojenih enzimatskom razgradnjom decidualnog tkiva i odvajanjem na gradijentu gustoće dokazano je 13% CD14<sup>+</sup> stanica (67), koje većinom izražavaju CD68 i CD11c biljege (69), što dokazuje njihovu pripadnost monocitno-makrofagnoj liniji. Ovi podaci su u skladu s procjenom, na temelju imunohistoloških studija, da makrofagi čine 30% imunokompetentnih stanica decidue (41).

Analiza protočnom citometrijom je pokazala da decidualne adherentne stanice izražavaju HLA DR molekulu u rasponu od 17,3-30,6% uz širu ogradu (70,71). Samo manji broj stanica je HLA-DP i HLA-DQ pozitivno (71). Doista, decidualni makrofagi *in vitro* mogu predočiti PPD ili dijelove citomegalovirusa (CMV) T limfocitima na HLA ovisan način, s učinkovitošću kao njihovi ekvivalenti u perifernoj krvi (70). Antitijelo usmjereno na HLA molekule razreda II značajno smanjuje predočavanje antigena, ali ga ne ukida u potpunosti, stoga je moguće da u decidui pored makrofaga postoji i druga antigen prezentirajuća stanična linija (70). Interesantno je da Mac-1 pozitivne stanice (makrofagi), u decidui stimulirane interferonom gama, mogu izražavati HLA antigene razreda II, ali ne i antigene razreda I (72). Bogat sadržaj lizosomskih enzima upućuje da su ove stanice dobro opremljene za fagocitozu (69). Vjerojatno razgrađuju tkivni debris nastao nakon urastanja trofoblasta u decidualno tkivo. Međutim, navedene funkcije samo su dio aktivnosti

decidualnih makrofaga. Oni se smatraju značajnom populacijom u citokinima posredovanoj regulaciji staničnih događaja u uspješnoj trudnoći. Luče prostaglandin E<sub>2</sub>, kojim sprječavaju stvaranje IL-2 i izražavanje  $\alpha$  lanca receptora za IL2 (CD25) u humanoj i murinoj decidui (73). Pored toga secerniraju citokine potrebne za rast i diferencijaciju stanica: čimbenik stimulacije monocita i makrofaga (M-CSF, od eng. Monocit Colony Stimulating Factor), interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) (74,75) i interleukin-15 (IL-15) (39,76), a u maloj količini čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , eng. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1) i interleukin-12 (IL-12).

### **1.3. Molekularni mehanizmi stanicama posredovane citotoksičnosti**

#### ***1.3.1. Perforinom posredovana citotoksičnost***

Perforin je bjelančevina različite molekulske težine od 66 do 70 kD. Razlog tome je stupanj glikozilacije molekule. Naime, ljudska molekula perforina posjeduje tri moguća mjesta za vezanje šećera, tj. glikozilaciju, a perforin glodavaca dva (77,78). Po građi i po funkciji djelomično je homologan komponentama komplekta koje sudjeluju u formiranju završnog kompleksa za lizu stanice (79). Najveću međusobnu sličnost perforina i C9 komponente komplekta pokazuje regija od 189-218 AK, koja ima hidrofobna svojstva i stvara konformaciju alfa uzvojnice, ali nije odgovorna za litičku funkciju ovih proteina (79). Suprotno očekivanju u domeni izvan homolognog područja na N terminalnom kraju pronađene su litičke sekvence. Slijed prvih 19 AK stvara  $\beta$  karotensku strukturu odgovornu za interakciju s fosfolipidnim dvoslojem i polimerizaciju perforinskih monomera u polimer u čijoj sredini nastaje pora. Promjer pore raste od 5-20 nm zbog progresivnog vezanja novih monomera perforina. Fosforilkolin predstavlja receptor za perforin, na koji se perforin veže u prisustvu kalcijevih iona i pH iznad 6 (80). Kako je fosforilkolin široko rasprostranjen na svakom tipu stanica, perforinom posredovan citolitički mehanizam je potencijalno opasan za sve stanice. Stoga se perforin, za razliku od C9 komponente komplekta koja cirkulira slobodno u plazmi, pohranjuje u citoplazmatskim zrcima, koja se samo na poticaj prazne procesom ovisnim o Ca<sup>++</sup> (77). Pročišćeni perforin ne može izazvati sve morfološke i biokemijske posljedice udružene u citotoksičnosti posredovanoj zrcima. On lizira većinu ciljnih stanica, ali ne izaziva

mjerljivu količinu cijepanja DNA (81). Nuklearne promjene u vidu kondenzacije kromatina i bubrenje jezgrine membrane, te cijepanje DNA i apoptoza, zasluga su serinskih esteraza i drugih proteaza koje su pohranjene zajedno s perforinom u staničnim granulama (82). Naime, granzimi A i/ili B moraju ući u stanicu kroz pore na staničnoj membrani da bi ostvarile svoj apoptotički učinak. Oni postižu jednak stupanj degradacije DNA neovisno o tvari koja formira pore. To im u fiziološkim uvjetima omogućuje perforin (83) na dva načina:

1. Prisutnost perforinskih pora na ciljnoj stanici izravno remeti homeostazu unutarstaničnog medija (osmolarnost) i pokreće homeostatske kompenzacijske mehanizme endocitoze, slično kao nakon oštećenja komplementom (84). Serinske i druge esteraze, otpuštene zajedno s perforinom iz citoplazmatskih zrnaca u blizini ciljne stanice mogu biti na taj način unešene u stanicu;
2. Neizravno, perforinske pore služe kao fiziološki transmembranski kanali za prolaz limfocitnih medijatora u stanicu npr. serinskih esteraza,  $TNF\alpha$  i  $TNF\beta$ , koji se nađu u tom području (77,85).

#### 1.3.1.1. Zastupljenost perforina u decidualnom tkivu

Izražavanje perforina je ograničeno na stanice citotoksičnog fenotipa. Glasnička RNA za perforin utvrđena je u nestimuliranim NK stanicama i  $\gamma/\delta$  limfocitima T (86,87), kao i u  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T limfocitnim klonovima porijeklom iz glodavaca i ljudi (88). Perforin pozitivne stanice dokazane već u endometriju sekrecijske faze menstrualnog ciklusa, kao priprema za uspješnu trudnoću (89). Nadalje, početkom normalne trudnoće u decidui miša i čovjeka javlja se velik broj perforin pozitivnih stanica s visokim sadržajem perforina u stanici (41). Prevladavanje perforin pozitivnih stanica, posebno u prvom tromjesečju humane trudnoće ukazuje da bi perforin u decidui mogao imati značajnu ulogu u zaštiti fetusa i u preživljavanju fetoplacentne jedinice (13). Pretpostavlja se da bi perforin mogao ograničavati trofoblastnu invaziju početkom trudnoće, ubijati aberantne stanice posteljice i embrionalne stanice, te spriječiti prijenos virusa i drugih unutarstaničnih nametnika iz majčine u fetalnu cirkulaciju (90). U vrijeme implantacije decidualne  $CD56^+$  NK stanice predstavljaju 70%-80% svih leukocita u endometriju (91). U suspenziji decidualnih leukocita također prevladavaju  $CD56^+$  stanice u odnosu na limfocite periferne krvi (48% vs

17%), a postotak perforin pozitivnih stanica je dva puta viši u suspenziji decidualnih leukocita, nego PBL (55% vs 27%) (13). Stoga je logično očekivati različitu raspodjelu perforina u staničnim populacijama za ta dva tkiva. Perforin pozitivne stanice u decidui pokazuju raspodjelu sličnu raspodjeli CD56<sup>+</sup> stanica (13). Područje koncentracije CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> stanica, oko krvnih žila i žlijezda neznatno se obilježava perforinom u imunohistološkim studijama (41). Metodom dvostrukog obilježavanja unutarstaničnog biljega-perforina i površinskih staničnih antigena (CD3, CD4, CD8 i CD56) u suspenziji decidualnih leukocita, dokazalo se najviše citotoksičnih NK stanica CD3<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD56<sup>bright</sup>-P<sup>bright</sup> fenotipa (13). Suprotno tome, citotoksični tip CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica je zastupljen u svega 4% decidualnih leukocita za razliku od 11% u perifernoj krvi (PK). Perforin pozitivne stanice u decidui i perifernoj krvi su porijeklom iz koštane srži, s razlikom da je u perifernoj krvi znatno više perforin pozitivnih stanica bez imunološkog pamćenja ("imunološki neiskusne"), u odnosu na deciduu (90% vs 58% CD45RA<sup>+</sup> stanica) (13).

### ***1.3.2. Citotoksičnost posredovana TNF i drugim članovima TNF glavne porodice bjelančevina***

#### ***1.3.2.1. Citotoksičnost posredovana Fas ligandom (FasL)***

Fas ligand (FasL) je molekula glavne porodice TNF bjelančevina, izražena na površini izvršnih stanica i predstavlja mehanizam brze citotoksičnosti posredovane stanicama (92,93). Fas L izaziva apoptozu osjetljivih ciljnih stanica vezanjem na Fas receptor, jer su samo stanice fenotipa Fas<sup>+</sup> podložne FasL izvršnim stanicama. Tako stanice koje pripadaju P815 staničnoj liniji, ako su transfecirane Fas, znatno više razvijaju apoptozu u kontaktu s perforin deficitarnim LAK stanicama, nego netransfecirane stanice iste linije (93). FasL je do sada utvrđen na limfocitima T, NK i LAK stanicama, te stanicama ekstraviloznog trofoblasta, oka i testisa (94). Značajno je da samo antigenski ili anti-CD3 antitijelima stimuliran limfocit T na svojoj membrani nakuplja FasL molekule za vrijeme od jednog do tri sata, što se može blokirati retinoičnom kiselinom ili glukokortikoidima (95). Ciklosporin A spriječava o Ca<sup>++</sup> ovisnu aktivaciju stanice i izražavanje FasL, te se zaključuje da je proces izražavanja FasL ovisan o Ca<sup>++</sup>. Apoptotički učinak stanica s već izraženim FasL predstavlja o Ca<sup>++</sup> neovisnu citotoksičnost (92). Stoga ciklosporin A, retinoična kiselina i glukokortikoidi nemaju utjecaja na liziranje ciljnih stanica već otprije

izraženim molekulama FasL na površini izvršne stanice (95). Donedavno se smatralo da stanica koja izražava na svojoj membrani FasL može ubiti Fas<sup>+</sup> ciljnu stanicu samo u izravnom dodiru tzv. nesekretornim mehanizmom citotoksičnosti. Međutim, novija istraživanja su pokazala da molekula FasL zadržava citolitički učinak nakon izlučivanja iz stanice i posreduje tzv. sekretorni mehanizam citotoksičnosti (96). Tako Jurkat T stanična linija po stimulaciji s PHA ushodno regulira izražavanje FasL na membrani, ali se ova smrtonosna molekula nishodno regulira na istoj staničnoj liniji već nakon jednog sata. Naime, FasL se izlučuje u supernatant, koji poprima citotoksička svojstva i učinkovito ubija nestimulirane Jurkat T stanice. Blokiranjem Fas receptora antitijelima uklonilo se 60-70% citotoksičnosti navedenog supernatanta (96).

Fas receptor (APO-1 ili CD95) je konstitucijski izražen na većini tjelesnih stanica, iako njegovu prisutnost na T limfocitima povećava stimulacija antitijelima protiv CD3 molekule ili T staničnog receptora (TCR). To je transmembranska molekula (48 kD), koja pripada glavnoj porodici receptora za čimbenike tumorske nekroze i receptora rasta živčanog tkiva (od eng. TNF/NGF Receptor Superfamily). Unutarstanična domena Fas receptora sastoji se od 70 AK i homologna je citoplazmatskoj domeni TNF-R1 molekule, a sadrži tzv. smrtonosnu domenu ili DD (od eng. Death Domain) za provođenje signala u stanicu. *In vitro* izazvane mutacije i delecije ove domene pokazale su da ne dolazi do provođenja signala za apoptozu posredovanog TNF-R1 i Fas receptorom (95). Strukturna analiza kompleksa FasL i Fas receptora magnetskom rezonancom je utvrdila da se tri molekule FasL vežu za tri molekule Fas receptora, koje potom udružuju svoje smrtonosne domene (DD) (97). Adaptorski protein FADD (od eng. Fas Associated Death Domain) također nazvan Mort 1 veže se vlastitom smrtonosnom domenom za udružene smrtonosne domene Fas receptora. Druga strana molekule FADD je tzv. DED (od eng. Death Effector Domain), koji se veže na analognu DED domenu zimogenog oblika kaspaze 8 ili FLICE (od eng. FADD-like interleukin-1b converting enzyme) ili March. DED (od eng. Death Effector Domain) kaspaze 8 je specifičan primjer općenitog načina aktivacije kaspaza (97). Tako se aktiviraju pored kaspaze 8 i kaspaza 2, kaspaze 9 i kaspaza 10 (97). Aktivirana kaspaza 8 slijedom kaskadnih reakcija aktivira sljedeće kaspaze npr. kaspaza 9 i dovodi do apoptoze stanice. Studije na deficijentnim miševima za FADD gen (98) su pokazale da je FADD neophodan za posredovanje apoptoze putem Fas receptora. FADD pored uvođenja u

apoptozu aktivacijom kaspaze 8 moguće ima i druge do sada nedovoljno istražene funkcije. Naime, FADD deficijentni miševi pokazuju slabiju proliferaciju zrelih limfocita T na antigenu stimulaciju, a FADD delecija uzrokuje i smrt embrija (98,99). Osim toga, neke druge bjelančevine stanice mogu se umjesto FADD molekule, vezati za DD Fas receptora (100). Tako vezana bjelančevina Daxx pokreće aktivaciju c-Jun NH2 terminalne kinaze (JNK), koja aktivira transkripcijski čimbenik c-Jun s antiapoptotičkim djelovanjem (68). Biološki značaj FasL/Fas mehanizma uglavnom se odnosi na tri tipa fiziološke apoptoze. Prvo je periferna delecija aktiviranih zrelih limfocita T na kraju imunološkog odgovora, što štiti organizam od sukcesivnih dodatnih valova proliferacije specifično senzibiliziranih limfocita (96). Singeničke limfocitne stanice su sposobne ubiti jedna drugu mehanizmom FasL-Fas (trans model), ali FasL i Fas receptor mogu ući u međudjelovanje i na istoj stanici (cis model). Tako se danas zna da se delecija CD4 Th1 stanica odvija trans i cis modelom, a delecija CD4 Th2 stanica samo trans modelom, jer one ne izražavaju FasL (101). Drugi tip Fas posredovane apoptoze je ubijanje virusima zaraženih ili maligno promjenjenih stanica citotoksičnim limfocitima T ili NK stanicama. Treći tip fiziološke apoptoze se odnosi na ubijanje upalnih stanica na tzv. "imunološki povlaštenim mjestima" kao što je npr. posteljica, testis ili oko (68).

#### 1.3.2.2. Citotoksičnost posredovana čimbenikom nekroze tumora $\alpha$ (TNF $\alpha$ )

Izravna uloga TNF $\alpha$  kao medijatora u reakcijama odgođene citotoksičnosti utvrđena je relativno nedavno, jer je njegovo sudjelovanje u lizi stanica bilo uvijek prekriveno brzim citolitičkim učincima perforina, FasL i TRAIL. TNF $\alpha$ , kao član TNF glavne porodice bjelančevina izražen je na membranama limfocita T, NK i LAK stanica, pa one u izravnom dodiru mogu ubiti ciljnu stanicu bez ograničenja prepoznavanja HLA molekule (93). Isto svojstvo imaju supernatanti LAK stanica sakupljeni tridesetog i šezdesetog sata kulture, što dokazuje da citotoksičnost posredovana TNF $\alpha$  ima pored nesekrecijsku (membranski TNF $\alpha$ ) i sekrecijsku komponentu (93). TNF $\alpha$  luče uglavnom aktivirani makrofagi, NK stanice i neke subpopulacije T limfocita (102). HLA antigeni razreda I povećavaju lučenje TNF $\alpha$  iz NK stanica periferne krvi (103). Vezanje TNF $\alpha$  na TNFR1, koji je izražen na većini tjelesnih stanica (68), aktivira transkripcijske čimbenike NF $\kappa$ B i c-Jun koji potiču proupalne i imunomodulacijske gene (104).



U pojedinim stanicama TNF $\alpha$  izaziva apoptozu putem TNFR1. Za razliku od FasL TNF $\alpha$  rijetko izazove apoptozu ciljne stanice, ako nije zakočena sinteza bjelančevina u ciljnoj stanici. Taj nalaz ukazuje da postojeći stanični čimbenici (bjelančevine) potiskuju apoptotički signal proveden putem TNFR1. Izražavanje tih supresivnih bjelančevina je kontrolirano NF $\kappa$ B i c-Jun transkripcijskim čimbenicima, jer njihova inhibicija dovodi do apoptoze (102). Mehanizam djelovanja TNF $\alpha$  uključuje trimeriziranje TNFR1 (105) i udruživanje njihovih unutarstaničnih smrtonosnih domena ili DD. Molekula TRADD (od eng. TNF Receptor Associated Death Domain) veže se svojom smrtonosnom domenom za smrtonosne domene trimeriziranih receptora. TRADD djeluje kao spona između receptorskih smrtonosnih domena i nekoliko puteva signaliranja. Tako se putem TRADD molekule može vezati FADD na receptorske smrtonosne domene i aktivirati kaspazu 8, kao što je opisano u putu signaliranja putem Fas receptora. FADD deficijentan miš je otporan na apoptozu posredovanu TNFR1. Istovremeno dok TRADD vezan za FADD posreduje apoptozu, TRAF2 (od eng. TNF Receptor Associated Factor 2) (106) i RIP (od eng. Receptor Interacting Protein) stimuliraju aktivaciju c-Jun i NF $\kappa$ B transkripcijske čimbenike. Aktivacija NF $\kappa$ B odvija se kaskadnom reakcijom, gdje se najprije aktivira tzv. NIK (od eng. NF $\kappa$ B Inducing Kinase), koja aktivira tzv. IKK (od eng. Inhibitor  $\kappa$ B kinase). Aktivirana tj. fosforilirana IKK otcjepljuje NF $\kappa$ B iz kompleksa sa inhibitorom. NF $\kappa$ B tada ulazi u jezgru i aktivira prepisivanje odgovarajućih gena. Put aktivacije c-Jun je također kaskadna reakcija, koja uključuje aktivaciju kinaza (68). Stanice TRAF-2 deficijentnog miša imaju samo neznatno manje NF- $\kappa$ B, ali potpuno im nedostaje aktivirani c-JUN u odgovoru na TNF $\alpha$ , što ukazuje na dominantnu ulogu TRAF2 u aktivaciji c-Jun transkripcijskog čimbenika. Suprotno tome RIP je neophodan za aktivaciju NF $\kappa$ B putem TNFR1, ali ne i za aktivaciju c-Jun (68).

### 1.3.2.3. Citotoksičnost posredovana TWEAK

TWEAK je novootkriveni smrtonosni ligand TNF glavne porodice bjelančevina (106,107). Pripada u bjelančevine široko rasprostranjene na gotovo svim tjelesnim stanicama (108). Poput FasL, TNF $\alpha$  i TRAIL molekule, TWEAK ligand se luči iz stanica, te posreduje citotoksičke učinke i na udaljenijim mjestima (108). Mišji i humani TWEAK ligand

(bjelančevina) podudaraju se u 93% aminokiselina u regiji, koja se veže za receptor. Receptor za ovaj smrtonosni ligand je tzv. DR3 receptor (od eng. Death Receptor 3) (109). DR3 pokazuje veliku sličnost sa TNF R1 u primarnoj strukturi, načinu provodnje signala u stanicu i učincima koje posreduje u stanici. Naime, oba receptora aktiviraju NF $\kappa$ B i potiču apoptozu u humanim stanicama (106,108). Međutim, postoji bitna razlika u raspodjeli ovih receptora na stanicama. TNFR1 izražen je ubikvitarno (104), a glasnička RNA za DR3 je prisutna u relativno manjem broju stanica: splenocitima, timocitima, perifernoj krvi, a ushodno se regulira po aktivaciji u limfocitima T (110). Zahvaljujući ovakvoj raspodjeli TWEAKa i DR3 nameće se zaključak da mišje tkivne stanice mogu ubiti izvršne stanice imunskog sustava, koje pod određenim okolnostima npr. upale dođu u tkivo. Tako, TWEAK, iako dijeli isti signalni mehanizam s TNF $\alpha$  ima drugačiju imunološku funkciju.

#### 1.3.2.4. Citotoksičnost posredovana TRAIL

TRAIL (od eng. TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) je 1996. g. otkriven član TNF porodice membranskih bjelančevina, koji pokazuje sličnosti sa FasL (111). TRAIL posreduje apoptozu u puno tumorskih vrsta stanica (111,112). Dok je izražavanje glasničke RNA za FasL i FasL bjelančevine uglavnom ograničeno na limfocite T i NK stanice, glasnička RNA za TRAIL se nalazi konstitutivno izražena u većini tkiva (68). TRAIL je izražen na membrani aktiviranih NK stanica glodavaca (107), a glasnička RNA za TRAIL ligand nalazimo i u svježe izoliranim mononuklearnim stanicama periferne krvi velikog broja ljudi (96). Limfociti T više od drugih stanica periferne krvi izražavaju glasničku RNA za TRAIL, a izražavanje bjelančevine je ushodno regulirano po stimulaciji T limfocita tj. razvijanjem blasta. Izražavanje TRAIL ustanovljeno je u Jurkat stanicama (T limfocitna linija) metodom Western blota (96) i ushodno se regulira na toj staničnoj liniji po stimulaciji s IFN $\alpha$  i IFN $\beta$ , ali ne i IFN $\gamma$  (113). Specifična poliklonska antitijela u nestimuliranim stanicama obilježila su bjelančevine molekularne težine 35 i 41 kD. Primarna struktura TRAIL molekule predviđa molekulsku masu od 35 kD (111), međutim TRAIL molekula posjeduje N glikolizacijska mjesta, te 41 kD bjelančevina može predstavljati glikoziliranu formu TRAIL molekule. U Jurkat stanicama po jednosatnoj stimulaciji s PHA Western blotom se nije utvrdio niti jedan oblik TRAIL molekule, da bi se TRAIL molekule ponovno obilježavale nakon sedam sati stimulacije jednakim

intenzitetom kao u nestimuliranim stanicama (96). Ovi rezultati ukazuju da se TRAIL ligand tijekom stimulacije obnavlja u Jurkat stanicama, ali i da se izlučuje u supernatant. Supernatanti Jurkat stanica pokupljeni jedan ili sedam sati po stimulaciji stanica s PHA citotoksični su prema nestimuliranim stanicama iste linije. Neutralizirajuća anti-Fas antitijela su samo djelomično uklanjala citotoksičnost supernatanta, ali kombinacija anti-Fas i anti-TRAIL antitijela potpuno je uklonila citotoksičnost supernatanta prema nestimuliranim Jurkat stanicama. Sličnu dinamiku izražavanja i lučenje TRAIL liganda poput Jurkat stanica pokazuju i humane mononuklearne stanice periferne krvi. Nedavno je otkriveno da TRAIL posreduje citotoksičnost CD4<sup>+</sup> T limfocitnih klonova humanog porijekla prema Jurkat stanicama i stanicama melanoma (114). Na temelju ovih rezultata dobivenih *in vitro* može se pretpostaviti uloga TRAIL u perifernoj deleciji klonova na kraju imunološkog odgovora. Tome u prilog govori i činjenica da zreli humani limfociti T stimulirani IL-2 *in vitro* postaju osjetljivi na TRAIL posredovanu apoptozu (96). Sugerirano je da FasL vrši prvenstveno deleciju CD4<sup>+</sup> klonova, dok je TRAIL zaslužan za deleciju CD8<sup>+</sup> klonova (115). Zama i suradnici (116) ukazuju da je funkcionalni TRAIL diferencijacijski biljeg humanih NK stanica. Naime, moguće je da NK stanice koriste različite medijatore citotoksičnosti tijekom diferencijacije. Fenotipski nediferencirane CD161<sup>+</sup> prekursorske stanice ubijaju TRAIL ciljane stanice. Diferenciranjem istih CD161<sup>+</sup> stanica u smjeru NK stanica one stječu sposobnost ubijanja putem perforina ili FasL, te stvaraju IFN $\gamma$  (116).

TRAIL se veže na receptore DR4 i DR5, te posreduje apoptozu ciljnih stanica aktivacijom kaspaza (96,117,118). Pokusi na FADD deficijntnim miševima, koji su otporni na apoptozu posredovanu Fas, TNFR1 i DR3 receptorom, nisu otporni na apoptozu posredovanu TRAIL (98). Tako DR4 receptor aktivira kaspazu na FADD neovisan način za razliku od DR5, koji uvodi stanice u apoptozu putem FADD molekule adaptera (68). Glasnička RNA za DR4 i DR5, koji posreduju apoptozu je raspoređena u većini zdravih tkiva, limfocitima periferne krvi, slezeni, timusu, tankom crijevu i tumorski promjenjenim stanicama, što znači da po prevođenju u protein DR4 i DR5 mogu posredovati apoptozu većine tjelesnih stanica (68,119,120). TRAIL ima snažnu antivirusnu aktivnost *in vitro* (121). Fibroblasti inficirani sa CMV ushodno reguliraju DR4 i DR5, dok IFN $\gamma$  nastao kao odgovor na CMV infekciju nishodno regulira izražavanje DR4 i DR5 receptora u

neinficiranim fibroblastima. Tako bi TRAIL mogao selektivno ubijati virusima zaražene stanice (121).

Jedan vid zaštite protiv apoptoze posredovan TRAIL je izražavanje tzv. receptora mamilica ili DcR (od eng. Decoy Receptora). Receptori mamilice DcR1 i DcR2 jesu bjelančevine ukotvljene u membrani stanice glikozilfosfatidilinozitolom i vežu TRAIL istim afinitetom kao DR4 i DR5. DcR1 u nedostatku unutarstaničnog dijela i DcR2 uslijed vrlo kratkog unutarstaničnog dijela ne provode u stanicu signal za apoptozu (122,123). Funkcija receptora mamilica je nadmetanje sa DR4 i DR5 i sprječavanje apoptoze (124). Za razliku od DR4 i DR5 koji jesu izraženi i u tumorskim tkivima receptori mamilice se uglavnom ne izražavaju na tumorima, pa je to objašnjenje zašto TRAIL uzrokuje smrt tumorskih stanica *in vitro*. Štoviše, TRAIL je potencijalno sigurniji čimbenik u borbi protiv tumora od TNF $\alpha$  i FasL. Naime, sistemske promjene davanjem TNF $\alpha$  u terapijske svrhe u miša uzrokuju teško upalno stanje slično septičkom šoku, zbog aktivacije proupalnog transkripcijskog čimbenika NF $\kappa$ B (68). Injiciranje agonističkih anti-Fas antitijela u miša oboljelog od tumora može biti letalno, jer oštećuje prvenstveno Fas<sup>+</sup> hepatocyte (100). TRAIL znatno slabije aktivira NF $\kappa$ B i to tek u puno većim koncentracijama nego TNF $\alpha$  (68). Široka rasprostranjenost specifičnih receptora mamilica za TRAIL u većini zdravih tkiva, ali ne i u tumorskim tkivima, govori u prilog pretpostavci da bi TRAIL mogao potaknuti apoptozu tumorskih stanica uz očuvanje normalnog tkiva (125). TRAIL bi mogao imati ulogu u zaštiti posteljice od imunološki kompetentnih stanica majke. Northern blot analizom utvrđene su glasničke RNA za TRAIL i sva četiri TRAIL receptora (DR4, DR5, DcR1 i DcR2) u humanim posteljicama (126). TRAIL bjelančevina je najintenzivnije izražena u sloju sinciotrofoblasta, koji je u izravnom dodiru s majčinom krvlju i makrofagima korionskih resica (Hofbauerovim stanicama). Stanične linije porijeklom iz stanica trofoblasta (JAR i JEG-3) i makrofaga (U937, THP-1) izražavaju glasničke RNA za TRAIL i DR5 (126). Navedene trofoblastne linije izražavaju glasničku RNA za DcR1, a makrofagne linije glasničku RNA za DcR2. Testovi citotoksičnosti su pokazali da su obje navedene trofoblastne linije bile otporne, a makrofagne linije djelomično osjetljive na ubijanje s rekombinantnom TRAIL molekulom (126).

#### 1.4. Mehanizmi regulacije citotoksičnosti reproduktivnim hormonima

Prvi izvještaji koji su upućivali da hormoni imaju učinke na imunološki sustav potječu iz 1898. g. kada je primjećeno da kastracija u zeca značajno povećava masu timusa (2). Suprotan učinak u timusu u odnosu na kastraciju postigao se injiciranjem gonadalnih steroida (2). Nadalje postoji puno dokaza da je stanicama posredovana imunost promjenjena tijekom trudnoće. Pickard (127) i Vaughan (128) su pokazali povećanu incidenciju pojedinih infekcija, a Gleicher malignoma tijekom trudnoće (129). Kožna reakcija na tuberkulin je smanjena, a preživljavanje kožnih alogeničkih transplantata u trudnica je bilo dvostruko dulje nego u netrudnih žena. Serum i supernatant posteljice sadrže hormone povezane s trudnoćom i moduliraju stanicama posredovan imunološki odgovor u žena koje nisu trudne (130,131).

Humani koriogonadotropin (hCG) se tijekom trudnoće proizvodi u posteljici također u velikim količinama, te igra bitnu ulogu u uspostavljanju trudnoće. On djeluje na žuto tijelo i stimulira ga na lučenje progesterona. U skladu s tim hCG u perifernoj krvi se naglo povećava u prvom tromjesečju trudnoće na 100 i.j./ml, a zatim pada ispod 80 i.j./ml (2). Nepročišćeni hCG preparati izdvojeni iz mokraće trudnice imaju značajnu imunološku aktivnost. Humani koriogonadotropin produžuje preživljavanje kožnog alotransplantata i koči umnožavanje alogenski stimuliranih limfocita (132). Međutim, pročišćeni preparati hCGa skoro su potpuno izgubili imunosupresivnu aktivnost (2). Slični rezultati su dobiveni s humanim laktogenom izdvojenim iz posteljice, koji je potisnuo limfocitnu proliferaciju, ali se supresivna aktivnost izgubila nakon pročišćavanja preparata (133). Nadalje, postoje podaci koji upućuju na razlike u imunološkom odgovoru u odnosu na spol (134,135). Muškarci izgleda imaju snažniji stanicama posredovan imunološki odgovor, nego žene, dok žene proizvode više antitijela nakon imunizacije. Incidencija autoimunih poremećaja je viša u žena tijekom reproduktivnog razdoblja (136). Ovi podaci su skrenuli pažnju prema spolnim steroidnim hormonima, kao regulatorima imunološkog odgovora. Žuto tijelo i posteljica proizvode puno estrogena, međutim malo je podataka, a oni često nisu usaglašeni, o učincima estrogena na imunološki odgovor (131). Tijekom folikularne faze porast serumske koncentracije estradiola udružen je s porastom monocita i granulocita u perifernoj krvi (137). Estrogen povećava stvaranje kolonija humanih mijelomonocitnih

stanica iz prekursorskih stanica, koje su osjetljive na čimbenik koji stimulira kolonije-CSF (od eng. Colony Stimulating Factor). *In vitro*, estrogen, u fiziološkim koncentracijama, povećava fagocitnu aktivnost makrofaga, ali ne i neutrofila (138). Nadalje, estrogen ne utječe na proliferaciju mitogenima stimuliranih kultura limfocita (139). Za razliku od progesterona, estradiol nije mijenjao citotoksičnost limfocita periferne krvi zdravih trudnica, čak ni u koncentraciji iznad fizioloških (140). Biološki značaj estrogena u održavanju trudnoće nije potpuno jasan, jer nakon odstranjenja žutog tijela progesteron je sam dovoljan da dozvoli razvoj normalne trudnoće. Progesteron je hormon karakterističan za trudnoću, koji se tijekom evolucije pojavio rano i sačuvao svoj izvorni oblik, što upućuje na njegovu važnost tijekom reproduktivnog razdoblja žene. Tijekom trudnoće, najprije se proizvodi u žutom tijelu kao odgovor na stimulaciju humanim koriogonadotropinom (hCG), a od 7 tjedna trudnoće posteljica preuzima steroidogenezu i postaje glavni izvor steroidnih hormona do kraja trudnoće (141). Za njegovu sintezu iz kolesterola potrebna su samo dva enzimatska koraka: oksidacija i cijepanje (141). U ljudi proizvodnja progesterona u posteljici postepeno raste tijekom trudnoće i doseže 3 µg/g tkiva posteljice. Serumska koncentracija progesterona tijekom trudnoće također raste od 30-160 ng/ml u odnosu na serumsku koncentraciju progesterona u žena koje nisu trudne (2). Rana trudnoća potpuno ovisi o žutom tijelu tj. progesteronu koji se u njemu stvara. Otklanjanje žutog tijela prije 6 ili 7 tjedna gestacije dovodi do prekida trudnoće u ljudi (142). Isto tako blokiranjem veznih mjesta za progesteron na receptoru za progesteron antagonistom progesterona RU 486 izazivaju se kontrakcije maternice i pobačaj u ljudi i u više vrsta sisavaca (7,143,144).

#### **1.4.1. Progesteron**

##### **1.4.1.1. Utjecaj progesterona na imunološki odgovor trudnice**

Jedan od prvih dokaza da progesteron utječe na imunološki sustav bila je spoznaja da broj leukocita u maternici glodavaca ovisi o hormonskom statusu (8). Ovariectomirane mišice tretirane s progesteronom, ali ne i s estrogenima, razvijaju absces u maternici nakon injekcije *E. coli*. Normalna stanična rezolucija u maternici štakora nakon poroda je sprječena ako se daje progesteron tijekom poslijeporođajnog perioda (8). Visoke lokalne koncentracije progesterona mogu prouzročiti preživljavanje ksenogenih ili alogenih kožnih

transplantata isto kao i kožnih transplantata smještenih u šupljinu maternice ovariektomirane ovce (145,146). Rast ksenogeničnih tumorskih stanica transplantiranih u maternicu hrčka bio je produžen davanjem progesterona (2). Odbacivanje se pojavilo odmah nakon ukidanja ovog hormona. U glodavaca bi supresijske stanice mogle imati važnu ulogu u prihvaćanju ploda. Clark (147,148,149) je otkrio specifične supresorske stanice u mišjoj decidui na mjestu implantacije, koje nisu specifične za antigen. To potkrepljuje činjenica da ekstrakt posteljice miša, koji među ostalim tvarima sadržava progesteron, može potaknuti nastanak stanica sa supresijskim aktivnostima iz limfocita slezene glodavaca (150,151). Supresijska aktivnost stanica iz mišje maternice mijenjala se u ovisnosti o fazama endometrijskog ciklusa i upućivala da bi progesteron mogao potaknuti razvoj i funkciju supresijskih stanica tijekom sekrecijske faze endometrijskog ciklusa i trudnoće (152).

Pavia (153) je istraživao sistemski imunološki odgovor u glodavaca i uočio da progesteron ne utječe na ubilačku aktivnost citotoksičnih limfocita. S druge strane Furokawa (63) je pokazao smanjenu NK aktivnost tijekom trudnoće u miša i fluktuaciju NK aktivnosti u skladu sa ovarijalnim ciklusom. Van Vlasselaer i Vandepute (154) su pokazali da preinkubiranje limfocita T s progesteronom (1-10  $\mu\text{g/ml}$ ) tijekom 16 sati blokira njihove izvršne funkcije. Radovi Szekeres-Bartho (2) pokazuju da progesteron tijekom trudnoće u fiziološkim koncentracijama snizuje NK aktivnost limfocita periferne krvi, jer limfociti periferne krvi trudnice slabo ili uopće ne mogu lizirati fetalne fibroblaste. Kultiviranje limfocita periferne krvi u serumu trudnice iz kojeg je uklonjen progesteron nije umanjilo NK citolitičku aktivnost (140). Naime, serum iz kojeg je dijalizom uklonjen progesteron izgubio je oko 80% sposobnosti blokiranja citolitičke aktivnosti NK stanica periferne krvi protiv fetalnih fibroblasta (155). Na temelju ovih rezultata zaključilo se da je progesteron tvar odgovorna za većinu blokirajuće aktivnosti u limfocitima trećeg tromjesečja humane trudnoće (140).

Staples i Heap (156) proučavali su da li progesteron blokira mitogenima potaknutu transformaciju limfocita u ovaca i nisu pronašli razlike u odnosu na reproduktivni status jedinke. Međutim, korištene su relativno velike koncentracije progesterona, koje su previsoke da bi se pokazale razlike u osjetljivosti limfocita periferne krvi na progesteron u trudnih i jedinki koje nisu trudne. Niske koncentracije progesterona, poput fizioloških

koncentracija progesterona u serumu tijekom trudnoće, dostatne su za *in vitro* uklanjanje NK aktivnosti u perifernoj krvi zdravih trudnica (157). To je utvrđeno uspoređivanjem citotoksične aktivnosti limfocita periferne krvi zdravih trudnica s citotoksičnom aktivnosti limfocita iz periferne krvi trudnica s patološkim trudnoćama, kao i limfocita žena koje nisu trudne, tretiranih različitim koncentracijama progesterona (50-400 nM). Zanimljivo da progesteron smanjuje citotoksičnost samo limfocita periferne krvi zdravih trudnica u koncentracijama koje odgovaraju fiziološkim u serumu tijekom trudnoće. Naime, za isti učinak u limfocitima periferne krvi žena koje nisu trudne ili žena s rizičnim trudnoćama potrebna je, *in vitro*, znatno veća koncentracija progesterona (139). Moguće je da limfociti periferne krvi trudnica s prijetecim pobačajem ili prijevremenim porodom nisu izloženi normalnoj koncentraciji progesterona i/ili ne mogu potpuno odgovoriti na progesteron u prisustvu inače normalne koncentracije ovog hormona. Međutim, Szekeres-Bartho i suradnici (158) su pokazali da se koncentracije progesterona u serumu trudnica sa zdravim i patološkim trudnoćama nisu razlikovale u pojedinim tjednima gestacije. Suprotno tome, citotoksična aktivnost limfocita periferne krvi prema fetalnim antigenima bila je veća tijekom patološke trudnoće (159). Iako je prisutnost progesterona u serumu trudnice neophodna za imunosupresiju, izgleda da je kapacitet vezanja progesterona ograničavajući čimbenik u cijelom procesu (158). Ispitivanje kapaciteta limfocita periferne krvi za vezanje progesterona u zdravoj trudnoći, u odnosu prema limfocitima trudnica s kliničkim simptomima pobačaja, odnosno prijevremenog poroda u sva tri tromjesečja trudnoće, pokazala su da limfociti zdravih trudnica imaju značajno viši kapacitet vezanja za progesteron, nego limfociti žena s patološkom trudnoćom (158). To objašnjava činjenicu da su limfociti zdravih trudnica osjetljiviji na blokiranje NK aktivnosti progesteronom, nego limfociti žena koje nisu trudne ili žena s patološkim trudnoćama. Pretpostavlja se da je tijekom normalne trudnoće, uz povećan kapacitet vezanja progesterona za limfocite i fiziološka koncentracija progesterona dostatna za učinkovito smanjenje citotoksične aktivnosti limfocita periferne krvi. Budući da se rezultati pokusa s leukocitima periferne krvi dobiveni *in vitro* ne mogu jednostavno prenijeti na situaciju *in vivo*, još uvijek nije jasno da li smanjenje kapaciteta za vezanje progesterona na lokalnoj razini tj. u decidualnim limfocitima može biti razlog nekom od patofizioloških događaja, kao što je prijeteci pobačaj ili prijevremeni porod (160).



## 1.4.1.2. Receptor za progesteron

### 1.4.1.2.1. Građa receptora za progesteron

Receptor za progesteron pripada u skupinu steroidnih receptora. Receptori za steroidne hormone pripadaju razredu proteina od 80-110 kD (161). Analiza pročišćenog glukokortikoidnog receptora, kao predstavnika steroidnih receptora ukazala je da su građeni od tri različite domene, a vezno mjesto za DNA ili hormon, iako su prisutni na istoj receptorskoj molekuli, mogu biti odvojeni ograničenom proteolizom. Receptori za steroidne hormone su strukturno organizirani u tri različite domene (162,163). Oni pokazuju varijabilnu N terminalnu regiju, kratku i dobro sačuvanu centralnu domenu i relativno dobro sačuvanu C-terminalnu polovicu (164). C-krajnji dio je vezno mjesto za hormon i u glukokortikoidnom receptoru ujedno dio odgovoran za ulaz u jezgru. Središnja domena je odgovorna za vezanje na DNA. N-krajnji dio se bolje upoznaje tek u zadnje vrijeme. Ova domena sadrži mnoge antigenske determinante i većina antitijela protiv receptora su usmjerena protiv tog dijela proteina (163). U ljudi su utvrđene dvije izoforme (bjelančevine i glasničke RNA) receptora za progesteron i nazvane A i B izoforme (165,166). Obje izoforme su proizvodi istog gena, ali su počeci njihova prepisivanja različite točke ili je prepisivanje regulirano različitim promotorima (166). Receptor za progesteron B na N terminalnom kraju posjeduje 164 aminokiseline više nego A izoforma receptora za progesteron (166). Hirata i suradnici (167) dokazali su treću izoformu receptora za progesteron u humanim spermatozoima i nazvali je izoforma S. Glasnička RNA za receptor za progesteron S najzastupljenija je forma u humanim spermatozoima, ali se nalazi i u humanom endometriju, iako mnogo manje izražena nego glasnička RNA za receptor za progesteron tipa A i B (167). Relativan odnos između izražavanja pojedinih izoformi receptora za progesteron može doprinositi specifičnim učincima progesterona na različitim tkivima (168,169). Selektivnim uklanjanjem gena za A izoformu receptora za progesteron na miševima dokazalo se da B izoforma utječe na reproduksijske funkcije (169). Metodom imunohistologije i RT-PCR reakcijom utvrđeno je izražavanje receptora za progesteron u gotovo svim fetanim tkivima do 20 tjedna gestacije (170). Prema kraju gestacijskog perioda izražavanje receptora za progesteron se statistički značajno smanjivalo i samo stanice endokrinog tkiva su trajno izražavale receptor za progesteron (170). Ovi rezultati upućuju na ulogu progesterona u razvoju organa u ljudi.

#### 1.4.1.2.2. Prijenos signala putem receptora za progesteron

Klasičan model djelovanja steroidnog hormona uključuje ulaz hormona difuzijom u citoplazmu i vezanje s unutarcitoplazmatskim receptorom, što dovodi do promjene konformacije kompleksa hormon-receptor (171,172). Posljedica promijenjene konformacije receptora vezanog s hormonom u glodavaca dozvoljava njegovo premiještanje u jezgru i vezanje za kromatin (172). Slobodan receptor za steroid može *in vivo* biti udružen sa oligomernim proteinom iz skupine proteina akutne faze, teškim oko 90 kD, čija je zadaća možda spriječiti ulazak slobodnog receptora u jezgru (173,174). Nakon vezanja s hormonom oligomerni protein se otcjepljuje od receptora i tek tada se receptor vezan za hormon može vezati za kromatin. Subcelularno frakcioniranje potvrdilo je ovu hipotezu dokazom o akumulaciji receptora za progesteron u jezgri i to na kromatinu (175). Na stanicama hepatoma štakora utvrdilo se da vezanje steroidnog receptora za kromatin potiče ili koči prepisivanje 50-100 gena (176). Do danas još uvijek nisu potpuno poznati unutarstanični mehanizmi odgovorni za učinke progesterona u ljudi. Humana B izoforma receptora za progesteron potiče prepisivanje gena (177). Izoforma A receptora za progesteron koči prepisivanje gena (177). Najnoviji radovi ukazuju na uključenost više citoplazmatskih glasnika u prijenos informacije s receptora za progesteron na gene. Smatra se da je različita aktivnost A i B izoforme posljedica aktivacije različitih medijatora u stanici i to slijedom aminokiselina na N terminalnoj domeni receptora (177). Otkrivena je inhibitorna domena na N terminalnim krajevima obiju izoformi humanog receptora za progesteron, koja je funkcionalno aktivna samo u izoformi A receptora. To ukazuje da različite konformacije A i B izoformi receptora za progesteron u stanici omogućavaju funkcijsku aktivnost inhibicijske domene samo u izoformi A (177). Nadalje, Boonyaratanakornkit i suradnici (178) su 2001. godine utvrdili specifičan poliprolinski motiv na N terminalnoj domeni receptora za progesteron, koji se izravno veže za SH3 domenu različitih citoplazmatskih signalnih molekula uključujući c-Src tirozin kinaze. Aktivacija članova Src porodice kinaza dalje aktivira MAP (od eng. Mytogen Activated Protein) kinaze u stanicama sisavaca i tako posreduje učinke progesterona, a ne kao što se donedavno mislilo da kompleks progesterona i receptora ima izravnu transkripcijsku aktivnost u ljudi (178).

Receptor za progesteron kojem nedostaje vezno mjesto za hormon, te ne može vezati progesteron, još uvijek zadržava sposobnost poticanja specifičnog genskog izražavanja tj. učinke kao progesteronom zaposjednut receptor (2). U zdravim stanicama receptor za progesteron je cjelovit i sadržava vezno mjesto za hormon. Međutim, maligno promjenjene stanice mogu izražavati samo fragment receptora za progesteron. Aktivirani fragmenti receptora za progesteron u nedostatku vezanja progesterona, mogu posredovati učinke slične djelovanju progesterona, kao poticanje prepisivanja pojedinih gena. Rezultat dugotrajnog poticanja izražavanja gena s aktiviranim fragmentom receptora (u odsutnosti hormona), dovodi do nesposobnosti stanice da valjano odgovori na hormonom zaposjednut receptor i ima za posljedicu nekontroliranu staničnu funkciju.

#### *1.4.1.2.3. Raspodjela receptora za progesteron u limfocitima periferne krvi tijekom trudnoće*

Istraživanje raspodjele i funkcije receptora za steroidne hormone vezanjem tricijem obilježenog liganda *in vitro* nije polučilo vjerodostojne rezultate, jer se funkcija receptora mijenjala vezanjem radioaktivne tvari (2). Stoga su imunohistološke metode u kojima su se koristila antitijela koja prepoznaju receptor dala više podataka o lokalizaciji receptora *in vivo*, iako su prvi pokušaji bili bezuspješni zbog denaturacije antigena na receptoru za progesteron uobičajenim sredstvima za fiksaciju (2,179,180,181,182). Szekeres-Bartho (183) je prva pokazala da limfociti periferne krvi trudnice posjeduju receptor za progesteron, smješten u citoplazmi i u jezgri, za razliku od limfocita periferne krvi žena koje nisu trudne. Obilježavanjem limfocita periferne krvi trudnica s nekoliko različitih antitijela usmjerenih prema antigenima receptora za progesteron utvrdilo se oko 15%, a među limfocitima periferne krvi žena koje nisu trudne svega 0,47% stanica koje izražavaju receptor za progesteron (183). Clemens (184) spekulira da limfociti trudnice posjeduju neku vrstu dodatnog veznog mjesta za progesteron, što bi moglo objasniti razliku u osjetljivosti na progesteron između limfocita periferne krvi trudnica i osoba koje nisu trudne. Osim toga citosolna vezna mjesta za progesteron (dio neokupiranog receptora za progesteron) u limfocitima trudnice sudeći prema veličini molekule i mehanizmu regulacije nije klasični receptor za progesteron. Naime, imunoblot analizom limfocita periferne krvi trudnice definiran je nevezani receptor za progesteron kao molekula manje molekulske

težine (oko 40 kD), što predstavlja samostalnu, slobodnu podjedinicu koja nije udružena za ostale dvije podjedinice klasičnog receptora za progesteron, čija molekularna težina iznosi oko 110 kD (185). Enzimskim imunoesejom utvrdio se niži broj veznih mjesta na receptoru za progesteron u limfocitima periferne krvi, nego u drugim tkivima osjetljivim na progesteron (185).

Lizom ovisnom o komplementu dokazalo se da su limfociti koji izražavaju receptor za progesteron isključivo CD8<sup>+</sup> fenotipa. Uklanjanje CD8<sup>+</sup> stanica iz suspenzije limfocita uklonila je oko 60% pozitivno obilježenih stanica, dok je uklanjanje CD4<sup>+</sup> stanica dovela do dvostrukog porasta limfocitne reaktivnosti s antitijelima protiv receptora za progesteron (2). Protočnom citometrijom i dvostrukim obilježavanjem limfocita anti-CD8 antitijelima i antitijelima protiv receptora za progesteron jasno se pokazalo da su gotovo svi limfociti koji izražavaju receptor za progesteron ujedno i CD8 pozitivni.

#### *1.4.1.2.4. Dinamika izražavanja receptora za progesteron u limfocitima periferne krvi tijekom normalnih i patoloških trudnoća*

Receptori za progesteron u limfocitima periferne krvi nisu utvrđeni u muškaraca i žena koje nisu trudne (183). Oni se pojavljuju u limfocitima periferne krvi oko desetog dana trudnoće i njihovo izražavanje postepeno se povećava tijekom trajanja normalne trudnoće (186). Statistički značajan porast broja progesteron pozitivnih limfocita utvrđen je između prvog i trećeg tromjesečja trudnoće (186). Za vrijeme poroda u terminu udio limfocita periferne krvi koji izražavaju receptor za progesteron statistički je značajno niži, nego u bilo kojem stadiju normalne trudnoće (186). Tijekom patoloških trudnoća udio limfocita periferne krvi s izraženim receptorom za progesteron statistički je značajno niži u odnosu na zdrave trudnice odgovarajuće gestacijske dobi, ali se ne razlikuje od limfocita periferne krvi žena koje nisu trudne (157). Nadalje, za vrijeme idiopatskih spontanih pobačaja udio limfocita periferne krvi koji izražavaju receptor za progesteron je niži u odnosu na udio limfocita, koji izražavaju receptor za progesteron tijekom normalnih trudnoća (186). Limfociti žena s kliničkim simptomima prijevremenog poroda pokazuju veću citotoksičnost prema fetalnim fibroblastima (159) i općenito veću imunološku reaktivnost prema aloantigenima i smanjenu osjetljivost na progesteron (160), nego limfociti žena s normalnim tijekom trudnoće (140). Pretpostavilo se da je neosjetljivost na progesteron

limfocita periferne krvi žena s patološkim tijekom trudnoće, bar djelomice, posljedica nedostatka receptora za progesteron u njihovoj citoplazmi i jezgri (158,160). To moguće uzrokuje povećanu imunološku reaktivnost limfocita periferne krvi trudnica s patološkim tijekom trudnoće prema aloantigenima (187). Stoga je upoznavanje regulacije izražavanja receptora za progesteron od posebnog interesa.

#### 1.4.1.2.5. Regulacija izražavanja receptora za progesteron

U klasičnim ciljnim tkivima, steroidni hormoni reguliraju trenutačnu staničnu razinu receptora (188,189). Progesteron nishodno regulira receptore za progesteron i estrogen, dok estrogen čini upravo suprotno tj. ushodno regulira oba navedena receptora (189,190). U suprotnosti s klasičnim endokrinim tkivima estrogeni u limfocitima ne reguliraju ushodno receptore za progesteron (183). To je posljedica nedostatka receptora za estrogene u neaktiviranim limfocitima periferne krvi (186). Izlaganje limfocita osoba koje nisu trudne fitohemaglutininu ili aloantigenima uzrokuje izražavanje receptora za progesteron, što upućuje da je izražavanje receptora za progesteron odraz aktivacijskog stanja limfocita (183). Transplantacija predstavlja idealan model za *in vivo* testiranje kako alogena stimulacija utječe na izražavanje receptora za progesteron. Ujedno pruža mogućnost za rasvjetljavanje da li je aloantigenska stimulacija sama po sebi dovoljna za izražavanje receptora za progesteron ili mora biti potpomognuta hormonskim zbivanjima koja se pojavljuju tijekom trudnoće. Izražavanje receptora za progesteron ispitivano je u bolesnika s transplantiranom jetrom (191). Kako ti bolesnici ujedno primaju imunosupresivnu terapiju, moguće je da lijekovi iz te skupine utječu na izražavanje receptora za progesteron, stoga su kontrolnu skupinu sačinjavale osobe koje su primile transfuziju krvi, a ne koriste nikakve lijekove. Izražavanje receptora za progesteron u limfocitima periferne krvi u transplantiranih bolesnika slično je kao i u trudnica (191). U perifernoj krvi bolesnika koji su primili transfuziju krvi udio limfocita koji izražavaju receptore za progesteron je viši (5,9±0,8%), nego u kontrolnoj skupini zdravih ljudi, ali niži nego u zdravih trudnica ili osoba s transplantiranom jetrom (191). Broj pozitivnih stanica nije ovisio o spolu, kliničkom statusu ili vremenu proteklom nakon transplantacije. Navedeni rezultati ukazuju da dugotrajna *in vivo* aloantigenska stimulacija može biti odgovorna za pojavljivanje receptora za progesteron tijekom trudnoće (183,191,192,193). P815 stanična linija mišjeg

mastocitoma transfecirana s genima koji kodiraju polimorfne HLA molekule razreda I i II pokazala je da su molekule razreda I i II glavnog sustava tkivne podudarnosti uključene u proces poticanja izražavanja receptora za progesteron u limfocitima žena koje nisu trudne (2). Međutim, iste stanice transfecirane s mišjim monomorfnim antigenom razreda I (Be37) nisu mogle potaknuti izražavanje receptora za progesteron na humanim limfocitima periferne krvi (2). Nadalje, mišji monomorfni HLA antigeni nishodno reguliraju izražavanje receptora za progesteron koji je potaknut stimulacijom s fitohemaglutininom. Za razliku od toga, polimorfni mišji antigeni glavnog sustava tkivne srodnosti, iako mogu inducirati receptor za progesteron na humanim limfocitima, ne mogu inhibirati izražavanje receptora za progesteron potaknuto fitohemaglutininom. Slični rezultati dobiveni su s humanom koriokarcinomskom staničnom linijom BeWo (194). Ta stanična linija izražava humani monomorfni antigen razreda I: HLA G, koji je uglavnom izražen na trofoblastu (194,195). Kako BeWo stanična linija ne izražava samo HLA-G antigen ne može se sa sigurnošću tvrditi da monomorfni HLA produkti nishodno reguliraju izražavanje receptora za progesteron potaknuto fitohemaglutininom. Možda izražavanje monomorfni HLA produkata mogu u određenim okolnostima (npr. u porodu) potaknuti prolaznu otpornost za aktivaciju receptora za progesteron. Za sada je malo poznato o imunološkim mehanizmima koji pokreću porod (196). Porod je udružen sa značajno smanjenim brojem receptora za progesteron u limfocitima periferne krvi (186). Taj fenomen može biti rezultat recirkulacije receptor negativnih limfocita nakon lokalne nishodne regulacije receptora za progesteron ili se poruka za nishodnu regulaciju receptora za progesteron može nalaziti u krvi. Za testiranje posljednje mogućnosti ispitivao se učinak seruma iz različitih razdoblja trudnoće na izražavanje mitogenima induciranih receptora za progesteron. Serum iz drugog tromjesečja trudnoće ne utječe, a serum sa kraja trudnoće nishodno regulira izražavanje receptora za progesteron potaknuto mitogenima. Dijaliza navedenog seruma s kraja trudnoće nije mijenjala njegovu učinkovitost (152), ali absorpcija istog seruma monoklonskim antitijelima W6/32 (usmjerenim prema humanim monomorfni HLA determinantama) poništila je taj učinak (197). Ovi rezultati ukazuju na moguću ulogu topljivih izoformi HLA-G molekula, koju luče subpopulacije trofoblasta, u regulaciji receptora za progesteron. Nadalje, ne radi se samo o topljivim izoformama HLA molekula, nego za vrijeme normalne trudnoće postoji mogućnost sučeljavanja fetalnih aloantigena s

majčinih limfocitima periferne krvi. Vjeruje se da stanice trofoblasta mogu prodrijeti u limfni čvor i slezenu, gdje se odvija imunološko prepoznavanje i uklanjanje tuđih antigena. Naime, krvi fetusa i majke ne dolaze u direktan dodir, ali na dodirnoj plohi majčinih i fetalnih tkiva fetalne stanice koje nose očeve antigene mogu prijeći u cirkulaciju majke. Tako trofoblastne stanice, a ponekad i njihovi djelovi, ulaze u vene maternice i emboliziraju plućne kapilare (198). U 36. tjednu gestacije nađeno je 2-8 trofoblastnih stanica na 1000 leukocita u perifernoj krvi majke (199,200). Studije u kojima su korištena monoklonska anti-trofoblastna antitijela dokazale su u majčinoj krvi tri populacije stanica sličnih trofoblastnim: polinukleirane stanice, diploidni tip stanica i anukleirane dijelove citoplazme vjerojatno nastale odcjepljivanjem od trofoblasta (199,201). Polinukleirane stanice su pronađene u oko 80% trudnica (201).

#### 1.4.1.3. Utjecaj antagonista progesterona na funkciju limfocita periferne krvi trudnica i ishod trudnoće

Puno je studija *in vitro* i *in vivo* rađeno s ciljem da se utvrde učinci uklanjanja progesteronskog djelovanja. U te svrhe korišteni su antihormoni. To su antagonisti hormona koji sprječavaju endogene hormone da ispolje svoje biološke učinke, najčešće blokiranjem staničnih receptora za hormon. Oni se vežu za receptor velikim afinitetom i specifičnošću, sporo odvajaju od receptora s ciljem da osiguraju učinkovito natjecanje s prirodnim hormonom, kao i odsustvo agonističke aktivnosti (202,203,204,205,206). Među steroidnim antagonistima progestini (RU 486 i ZK98734) su najbolji prema navedenim svojstvima, iako niti jedan od njih nije potpuno specifičan za receptor za progesteron, nego se vežu i za receptor za glukokortikoide (204,205,206,207). ZK 98734 je antiprogesteronski steroid koji je 3-10 puta jače abortivno sredstvo u životinja, a ujedno s manjom glukokortikoidnom aktivnošću nego RU486 (207). Usporedba funkcije limfocita u uspješno završenim trudnoćama s onim u neuspješno završenim, omogućuje osvjetljavanje uloge imunoloških mehanizama u održavanju trudnoće. Davanje blokatora receptora za progesteron u ranoj trudnoći u ljudi i glodavaca uglavnom vodi u pobačaj (204), iako u nekih trudnica taj učinak nije zabilježen (205). Limfociti periferne krvi žena koje su tijekom petog ili šestog tjedna gestacije koristile antagoniste progesterona ZK98734 kao sredstvo za izazivanje slobodno izabranog prekida trudnoće, pokazuju već od drugog dana

terapije peterostruki porast citotoksičnosti limfocita periferne krvi prema fetalnim fibroblastima, smanjeno vezanje progesterona i smanjenu osjetljivost na progesteron (207). Ove laboratorijske nalaze pratilo je krvarenje iz maternice, također od drugog dana. Utvrđivanje razine  $\beta$ 1-glikoproteina u serumu trudnice koristilo se za praćenje zasićenosti trofoblasta progesteronom. Naime,  $\beta$ 1-glikoprotein specifičan je za trudnoću, jer se primarno stvara u sinciciotrofoblastu humane posteljice pod stimulacijom progesteronom (208,209). Može se utvrditi u majčinom serumu već desetog dana nakon začeća, a njegova koncentracija se postepeno povećava sve do poroda (209). Kako se ovaj spoj stvara pod utjecajem progesterona, njegovo smanjivanje ili izostanak u serumu znači nedostatak progesteronske stimulacije u fetoplacentnoj jedinici. U žena koje su koristile antagonist progesterona koncentracija  $\beta$ 1-glikoproteina se u serumu smanjivala (207), kao i koncentracija hCG. Antagonist progesterona ZK98734 primjenjivan u visokoj dozi (100 mg/dan) ostvaruje učinke na veznim mjestima za progesteron u stanicama trofoblasta i u limfocitima periferne krvi. U osoba koje slabo odgovaraju na terapiju antagonistom progesterona, 100 mg/dan antagonista dovoljno je da zauzme receptore u trofoblastu, ali nedostatan za potpuno zauzimanje veznih mjesta u limfocitima periferne krvi. Kao posljedica toga ne gubi se odmah osjetljivost na progesteron. Nadalje iste osobe tretirane nižom dozom antagonista progesterona (50 mg/dan) nisu pokazivale značajnije zauzimanje veznih mjesta ni na trofoblastu niti u limfocitima periferne krvi. Smanjenje  $\beta$ 1-glikoproteina specifičnog za trudnoću i smanjenje osjetljivosti na progesteron nije se zamijetila u tih žena i trudnoća se nastavila (207). Do danas nije odgovoreno da li to znači da uklanjanje progesteronom posredovane imunosupresije označava prirodni početak poroda.

#### 1.4.1.4. Otkrivanje i izdvajanje progesteronom induciranog blokirajućeg faktora (PIBF)

Spoznaja da supernatanti progesteronom stimuliranih limfocita zdravih trudnica snažno blokiraju NK posredovanu lizu upućivali su da progesteron djeluje putem posrednika (210). CD4 ili CD56 depletirani limfociti trudnice stimulirani progesteronom također su uklanjali NK posredovanu lizu, ali to nije mogla učiniti i CD8 depletirana frakcija (210). Supernatanti progesteronom stimuliranih limfocita trudnica u prisutnosti blokatora receptora za progesteron RU486 nisu posjedovali navedenu aktivnost, kao ni supernatanti



limfocita žena koje nisu trudne ili trudnica s prijetućim prijevremenim porodom (211). Ovi rezultati ukazuju da je progesteronom posredovano smanjenje NK aktivnosti rezultat specifičnog vezanja progesterona za receptor za progesteron, a ne receptora za glukokortikoide (211). Stoga se zaključilo da je stimulacija progesteronom CD8<sup>+</sup> limfocita koji izražavaju receptor za progesteron odgovorna za stvaranje tvari s imunosupresijskim djelovanjem. Nadalje, stimuliranje limfocita periferne krvi cikloheksamidom (blokator sinteze proteina), uklonila se sposobnost navedenih supernatanata da smanjuju NK aktivnost, što upućuje na potrebu sinteze jednog ili više proteina. Prvi pokušaj izdvajanja djelotvornog specifičnog medijatora progesteronskog djelovanja bio je iz supernatanata progesteronom stimuliranih limfocita zdravih trudnica filtracijom na Amikon filteru (PM10) (210,212). Aktivna tvar djelomično je pročišćena gel filtracijom, a zatim je pročišćavana filtracijom na Amicon filterima (XM50 i XM30), te se identificirala na temelju njezine imunološke aktivnosti. Tijekom testiranja na SDS poliakrilamid gel elektroforezi utvrdilo se da aktivna supstancija dobivena kromatografijom sadrži nekoliko traka različite molekulske težine: 67, 56, 40 i 34 kD. Uklanjanjem većine proteina većih molekularnih masa na Amikon filteru XM50 nije se značajno uklonila sposobnost blokiranja NK aktivnosti. Tako se zaključilo da je 34 kD protein odgovoran za posredovanje imunoloških funkcija progesterona. Kako se na početku radilo o blokiranju citotoksičnosti limfocita periferne krvi (19,213,214), protein je nazvan progesteronom induciran blokirajući faktor (PIBF od eng. Progesterone Induced Blocking Factor). Nedavno je otkrivena primarna struktura PIBF (slijed amino-kiselina), te se danas proizvodi rekombinantni PIBF (Szekeres-Bartho, neobjavljeni rezultati).

#### *1.4.1.4.1. Kretanje koncentracije PIBF u ljudskom serumu za vrijeme normalnih i patoloških trudnoća*

Polazeći od spoznaje da su limfociti trudnice pod stalnim utjecajem progesterona *in vivo*, tragalo se za PIBF u serumu zdravih trudnica. Doista ELISA esejom utvrđen je u serumu zdravih trudnica protein koji reagira s anti-PIBF antiserumom (140,212). Koncentracija PIBF u serumu nije se značajnije mijenjala u odnosu na dob gestacije (od 6-40 tjedna) ili broj prethodnih trudnoća (215). Koncentracija PIBF u serumu trudnica s prijetućim pobačajem ili prijevremenim porodom značajno je niža od koncentracije PIBF u zdravim

trudnica (160). Većina seruma u razdoblju predviđenom za porod imala je nižu koncentraciju PIBF, nego tijekom trudnoće, ukazujući na međuovisnost serumske koncentracije ove tvari i završetka trudnoće. Štoviše, sve žene s normalnom koncentracijom PIBF održale su trudnoću do predviđenog vremena za porod, za razliku od žena sa niskom koncentracijom PIBF (160). Tako je koncentracija PIBF u plazmi bila točniji pokazatelj ishoda trudnoće nego prisutnost kontrakcija maternice (160).

#### 1.4.1.5. Imunološki učinci progesteronom induciranoog blokirajućeg faktora (PIBF)

Prethodno je već opisano da PIBF inhibira NK aktivnost, ali ovaj čimbenik učinkovito sprječava i proliferaciju alogenski stimuliranih limfocita u kulturi pomiješanih limfocita. Chaouat navodi da nekoliko čimbenika (216) tijekom trudnoće mogu biti posrednici lokalne imunosupresije pod direktnim utjecajem posteljice (217). Te spoznaje su usmjerile istraživanja prema istraživanju da li su supresijske stanice uključene u regulaciju proliferacije limfocita pomiješanih u kulturi tj. da li učinci supresijskih stanica čine dio imunoloških učinaka PIBF. Kako bi se to ispitalo postavile su se kulture pomiješanih limfocita u prisutnosti PIBF. Stanice (stimulatori i responderi) dobivene u takvom testu ponovno su se postavile kao stimulacijske u reakciju pomiješanih limfocita s nesrodnim izvršnim limfocitima. Limfociti ili CD4-depletirani limfociti "educirani" u prvoj reakciji pomiješanih limfocita u prisustvu PIBF bile su značajno supresijske tijekom druge reakcije pomiješanih limfocita. Supresijsko obilježje nije se pojavilo u populaciji CD8-depletiranih limfocita ili nedepletiranih limfocita tijekom reakcije pomiješanih limfocita u prisutnosti RU 486. U ponavljanim reakcijama pomiješanih limfocita koristile su se stimulatorske i responderske stanice različitih nesrodnih osoba i rezultat je uvijek bio razvoj stanica sa supresijskim svojstvima, ukazujući da HLA identitet nije potreban za aktivaciju regulacijskih stanica. CD4/CD8 odnos nije narušen u populacijama stanica u reakcijama pomiješanih limfocita u prisustvu progesterona. Međutim, zamijećene su promjene unutar samih populacija. Subpopulacija CD4<sup>+</sup> induktora se smanjila na račun CD4<sup>+</sup> supresijskih stanica. Unutar CD8 subpopulacije broj citotoksičkih stanica se značajno smanjio uz istovremeno umnožavanje supresijskih stanica. Takve promjene nisu primjećene u reakcijama pomiješanih limfocita u prisustvu RU 486. Da bi se dobila potpunija slika djelovanja PIBF istraživalo se da li je stvaranje ili djelovanje IL-2 također promjenjeno. Za

tu studiju koristila se IL-2 ovisna stanična linija CTLL2. Kao izvor IL-2 korišten je medij za kulturu stanica oplemenjen sa supernatantom limfocita kultiviranih s fitohemaglutininom. Supernatant progesteronom stimuliranih limfocita nije mijenjao proliferaciju limfocita u odnosu na IL-2 obogaćen medij, što je potvrda da progesteron ne utječe na proizvodnju IL-2. Svi ovi rezultati ukazuju da progesteron ne smanjuje proliferaciju alogenski stimuliranih limfocita izravno, nego neizravno, putem HLA nerestriktivne supresorske petlje. Rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju da bi koncentracije progesterona na materno-fetalnom spoju mogle aktivirati supresijski put uključen u održanje trudnoće (187,218).

#### *1.4.1.5.1. Mehanizam sniženja citotoksičnosti posredovan progesteronom induciranim blokirajućim faktorom (PIBF)*

Arahidonska kiselina povećava citotoksičnost limfocita periferne krvi na doza ovisan način (2). Supernatant progesteronom stimuliranih limfocita značajno smanjuje citotoksičnost limfocita periferne krvi, a taj blokirajući učinak supernatanta poništio se dodatkom egzogene arahidonske kiseline (2). Slično je pronašao Wilson (219) u endometrijskim stanicama. Naime, progesteron je modulirao oslobađanje arahidonske kiseline izravnim djelovanjem na aktivnost fosfolipaze A2, koja oslobađa arahidonsku kiselinu iz fosfolipida stanične membrane. Međutim, dalje se arahidonska kiselina metabolizira putem dva enzimska sustava. Leukotrieni nastaju lipooksigenaznim putem, a prostaglandini, tromboksan i prostaciklin nastaju ciklooksigenaznim putem. Leukotrieni i prostaglandini su heterogene skupine spojeva, što otežava ispitivanje njihovog učinka na citotoksičnost. Inhibitor lipooksigenaze (BW755C) značajno snizuje citotoksičnost limfocita periferne krvi (220), ali je nespecifičan, jer reducira sintezu prostaglandina u istom obimu ili više od indometacina. Stoga, reducirana citotoksičnost u prisustvu BW755C može biti rezultat oštećene produkcije prostaglandina, te se manjak leukotriena ne može smatrati uzrokom smanjene citotoksičnosti. Učinak indometacina na citotoksičnost daje zbunjujuće rezultate (221). Seaman (222) i Carine (223) su utvrdili da indometacin nema učinka, a Antonaci (224) inhibicijski učinak na citotoksičnost. Postojeće razlike oko učinka indometacina mogu potjecati od razlika u koncentraciji indometacina korištenim u navedenim pokusima, kao i o ispitivanom tkivu. S druge strane mononuklearne stanice periferne krvi stvaraju

različite serije prostaglandina (npr. PGE i PGF) u odgovarajućem odnosu, a pojedine tvari (stimulatori ili inhibitori) možda selektivno blokiraju ili stimuliraju pojedine serije prostaglandina, koje mogu imati drugačije učinke na citotoksičnost. Za PGF $2\alpha$  dugo se smatralo da *in vitro* nemaju imunološku funkciju, ali Szekeres-Bartho (225) je utvrdila da povećavaju citotoksičnost u limfocitima periferne krvi trudnice. Imunosupresijski učinak supernatanta decidualnih stanica glodavaca pripisuje se PG serije E (226). Oni nishodno reguliraju IL-2 receptore i IL-2 proizvodnju (227,228). Detaljnije ispitivanje učinaka prostaglandina omogućuju lipopolisaharidi (LPS), koji stimuliraju sintezu prostaglandina bez utjecaja na stvaranje leukotriena (214). Lipopolisaharidi u koncentraciji 10  $\mu\text{g/ml}$  značajno povećavaju citotoksičnost limfocita periferne krvi. Navedeni učinak je izostao ukoliko su limfociti bili prethodno stimulirani s 400 nmola progesterona ili PIBF (2). PIBF inhibira oslobađanje arahidonske kiseline, tako da u tim uzorcima nema prekursora za sintezu prostaglandina. Da doista PIBF smanjuje otpuštanje arahidonske kiseline iz mononuklearnih stanica, dokazuje podatak da arahidonska kiselina dodana u suspenziju limfocita periferne krvi u prisutnosti progesterona uklanja učinak navedenog proteina (2). Preinkubacija limfocita žena koje nisu trudne sa PGF $2\alpha$  uzrokuje porast njihove citotoksičnosti. Progesteron ima suprotan učinak i značajno smanjuje njihovu citotoksičnost, štoviše u mogućnosti je obrnuti učinak PGF $2\alpha$ . Nadalje, u posteljici postoji korelacija između koncentracije progesterona i aktivnosti prostaglandin dehidrogenaze (229). Progesteron možda aktivira prostaglandin dehidrogenazu i tako ubrzava katabolizam prostaglandina. Ovi rezultati upućuju da se progesteron upliće na više mjesta u metabolizmu arahidonske kiseline (uklanja učinak fosfolipaze A $2$  i PGF $2\alpha$ , te povećava razgradnju prostaglandina), što ukazuje da tijekom normalne trudnoće mora postojati precizna ravnoteža između progesterona i prostaglandina, koja utječe na funkciju limfocita (230).

Acetilsalicilna kiselina smanjuje sintezu prostaglandina, te se koristi u terapiji trudnica u kojih postoji rizik od prijevremenog poroda. Kapacitet vezanja progesterona u grupi trudnica liječenoj acetilsalicilnom kiselinom značajno je porastao, citotoksička aktivnost i broj prijevremenih porođaja značajno se smanjio u odnosu na grupu neliječenih istim lijekom (2). Tako acetilsalicilna kiselina može biti odgovarajuća terapija za liječenje prijetjećih pobačaja i prijevremenih poroda u žena sa povećanom citotoksičnom aktivnošću

limfocita periferne krvi. Daljnja istraživanja o uključenosti pojedinih prostaglandina u posredovanju učinaka acetilsalicilne kiseline nisu dala očekivane rezultate. Naime, dobiveni rezultati *in vivo* su zbujujući. Postoje dokazi za i protiv supresijskog učinka PGE2 (227). Ching (231) je utvrdio pozitivnu korelaciju između koncentracije PGF2 $\alpha$  i citotoksične aktivnosti NK stanica krvi pupčane vene.

#### 1.4.1.5.2. Utjecaj progesteronom inducirano $\beta$ g blokirajućeg faktora (PIBF) na lućenje citokina

Prvi prepoznati učinak PIBF bio je blokiranje citotoksične aktivnosti NK stanica periferne krvi trudnica prema fetalnim fibroblastima *in vitro* (2,140), po čemu je ova bjelančevina i dobila ime. Rezultati mjerenja koncentracije PIBF ELISA esejom pokazali su da i *in vivo* koncentracija PIBF u serumu trudnica korelira sa sposobnošću inhibicije citotoksičnosti limfocita periferne krvi (232). Do danas mehanizam kojim se ostvaruje imunosupresija posredovana progesteronom/PIBF, nije potpuno razjašnjena, iako je Chaouat još 1987. g. (216) smatrao da postoji više posrednika uključenih u ovaj mehanizam. Dokazan velik broj CD4<sup>+</sup> stanica koje potiču razvoj CD8<sup>+</sup> stanica supresijskih po funkciji u kulturi pomiješanih limfocita u prisustvu progesterona (212,217), prvi je dokaz za tvrdnju da PIBF osigurava povoljan ishod trudnoće poticanjem lućenja citokina koji potiskuju stanicama posredovan imunološki odgovor (187,216,233). Pokusi *in vivo*, na životinjskom modelu potvrđuju da je učinak PIBF posredovan citokinima (65). Neutralizacijom endogenog PIBF specifičnim antitijelima, smanjuje se stvaranje IL-10, a povećava stvaranje IL-12 i TNF $\alpha$  u splenocitima miša, kao i NK aktivnost, što je dokazano ELISA esejom, odnosno "Single-cell" esejom citotoksičnosti (65). IL-4 i IL-10 izlučeni iz splenocita trudne mišice *in vivo* nakon intraperitonealne primjene progesteron/PIBFa, mogu smanjiti postotak resorpcije ploda u križanju CBA/J ženke i DBA/2 mužjaka (213,234). IL-4 i IL-10 također sprječavaju pobačaj umjetno izazvan s tvari C12U, koja povećava lućenje IFN $\gamma$  (235). U ljudi je ELISA esejom odnosno imunocitokemijskim obilježavanjem utvrđeno povećano lućenje IL-12, a smanjeno izražavanje PIBF i IL-10 u limfocitima periferne krvi trudnica s patološkim tijekom trudnoće, za razliku od učestalije izraženosti PIBF i IL-10 u limfocitima periferne krvi zdravih trudnica (65). Limfociti periferne krvi žena koje nisu trudne luče manje IL-12 u odgovoru na stimulaciju s

fitohemaglutininom + PIBF, nego samo na stimulaciju s fitohemaglutininom. Kasniji radovi su pokazali da PIBF povećava produkciju Th2 tipa citokina u humanim aktiviranim limfocitima periferne krvi (IL-3, IL-4, IL-10) (236,237). Vrlo slično lučenje citokina je upravo svojstveno za humanu deciduu prvog tromjesečja normalne trudnoće: obilje IL-10 i drugih citokina Th2 imunološkog odgovora (IL-4, IL-5, IL-6), a znatno smanjeno lučenje IL-12, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  i IL-2 svojstvenih za Th1 imunološki odgovor (8,74). Odgovorni čimbenici, koji uzrokuju Th2 imunološki odgovor još nisu dokazani, a progesteron/PIBF bi mogao biti jedan od njih (4). Szekeres-Bartho spominje da  $\gamma/\delta$  stanice prisutne u decidui izražavaju receptor za progesteron i moguće prve luče veće količine IL-4 u decidui, koji dalje potiče lučenje Th2 citokina (4).

Piccinni (235) je utvrdila da prethodno uspostavljeni Th1 klonovi izvedeni iz limfocita periferne krvi, isto kao i klonovi iz decidualnih limfocita, stimulirani s anti-CD3 antitijelima u prisutnosti progesterona luče više IL-4, IL-5 i ushodno reguliraju izražavanje CD30 molekule. Drži se da je CD30 biljeg Th2 staničnih klonova (235). U istim klonovima kultiviranim u prisutnosti progesterona Northern blot analizom je utvrđeno više glasničke RNA za IL-4 u odnosu na količinu glasničke RNA za IL-4 u Th1 klonovima nestimuliranim sa progesteronom. Osim toga izražavanje glasničke RNA za IL-4 bila je uvijek veća u decidualnim klonovima zdravih trudnica, nego u klonovima izoliranih iz decidua nakon spontanih pobačaja, što ukazuje na povoljni učinak IL-4 na tijek trudnoće (238).

#### **1.4.2. Imunomodulacijski učinci pojedinih citokina**

##### **1.4.2.1. Interleukin-2**

###### **1.4.2.1.1. Otkriće i uloga interleukina-2**

Interleukin-2 (IL-2) je otkriven kao čimbenik rasta limfocita T u supernatantima limfoblasta stimuliranih s fitohemaglutininom *in vitro* (239). Ovaj citokin u najvećoj mjeri luči Th1 CD4<sup>+</sup> subpopulacija limfocita T, iako CD8<sup>+</sup> limfociti T, pa čak i NK stanice imaju sposobnost lučenja interleukina-2 u manjoj mjeri. Limfociti T stimulirani putem TCR receptora luče značajno više IL-2 od nestimuliranih limfocita i ushodno reguliraju  $\alpha$  i  $\beta$  lanac receptora za IL-2. Tako se učinci IL-2 ostvaruju na autokrini ili parakrini način i

ograničeni su na stanice specifične za antigen tj. odgovarajući klon specifičan za antigen, koji je doveo do lučenja IL-2. Pored proliferacije aktiviranih limfocita, IL-2 podržava funkcijsku diferencijaciju zrelih limfocita, osobito citotoksična fenotipa. Kasnije je interleukin-2 prepoznat kao čimbenik rasta i diferencije i limfocita B i NK stanica, te kao aktivator makrofaga (240). IL-2 deficijentni miševi imaju normalan razvoj limfatičnih stanica (240) i samo umjerene nedostatke u imunološkom odgovoru (241), što upućuje na mnogobrojna međudjelovanja ovog citokina sa drugim čimbenicima rasta i diferencijacije. Učinci IL-2 na proliferaciju, citotoksičnost i produkciju citokina preklapaju se s učincima IL-12, iako navedeni citokini ne djeluju putem istih receptora, te sa interleukinom-15 s kojim IL-2 čak dijeli komponente receptora ( $\beta$  i  $\gamma$  lanac). Međutim, detaljnijim analizama postaju sve jasnije razlike između ovih citokina na pojedine stanične funkcije u pojedinim subpopulacija limfocita. Tako npr. IL-2 jače pokreće stanični ciklus tj. proliferaciju limfocita T i izražavanje  $\alpha$  lanca receptora za IL-2 i lučenje TNF $\alpha$ , a IL-12 jače izaziva lučenje IFN $\gamma$  (242). Interleukin-15 snažnije od IL-2 potiče proliferaciju i diferencijaciju NK stanica (243).

Pleiotropna svojstva IL-2 ukazuju na njegovo središnje mjesto u imunološkoj obrani protiv mikroorganizama ili aloantigena. IL-2 može potaknuti apoptozu limfocita T na vrhuncu imunološkog odgovora u času kada treba obuzdati prekomjeran rast klonova specifičnih za antigen, koji je potaknuo imunološki proces (244,245). Interleukin-2 sudjeluje u apoptozi poticanjem izražavanja Fas liganda (FasL) na T limfocitima (244,246). FasL nije jedini mehanizam kojim antigenom stimulirane stanice umiru apoptozom, jer IL-2R $\beta$  deficijentan miš ima održanu perifernu deleciju limfocita T nakon stimulacije superantigenom (247). Članovi glavne porodice TNF bjelančevina, npr. TRAIL također može sudjelovati u perifernoj deleciji klonova (96,114,115)

#### *1.4.2.1.2. Građa receptora za interleukin-2 i prijenos signala*

Receptor za IL-2 sastoji se od tri lanca bjelančevina nazvanih alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) i gama ( $\gamma$ ) podjedinice. Alfa lanac IL-2 receptora je bjelančevina molekularne težine 55 kD, te se još naziva p 55, a po CD klasifikaciji (od eng. Cluster of Differentiation) CD25 molekula. Ovaj lanac sam veže IL-2 niskim afinitetom, ali udružen s  $\beta$  i  $\gamma$  podjedinicom predstavlja receptor visokog afiniteta za IL-2. Beta i  $\gamma$  podjedinica udružene zajedno vežu IL-2

intermedijarnim afinitetom i ulaze u sastav ne samo receptora za IL-2 nego i receptora za IL-15 (76,248,249). Zanimljivo da  $\alpha$  lanci IL-2 i IL-15 receptora pokazuju visoki stupanj homologije, ali usprkos tome vežu IL-2 odnosno IL-15 visokom specifičnošću (250). Alfa lanac interleukina-2 konstitutivno je izražen na timocitima u razvoju, ali samo na zrelim aktiviranim limfocitima T i u puno manjoj mjeri na NK stanicama. Beta lanac konstitutivno je izražen na zrelim T i NK stanicama, monocitima/makrofagima, neutrofilima (240), kao i na timocitima u vrijeme razvoja. Slično  $\alpha$  lancu,  $\beta$  lanac se ushodno regulira po aktivaciji stanice. Gama lanac se izražava uglavnom na istim staničnim populacijama kao i  $\beta$  lanac, ali za razliku od  $\alpha$  i  $\beta$  lanca nishodno se regulira već nakon 4 sata po stimulaciji (251).

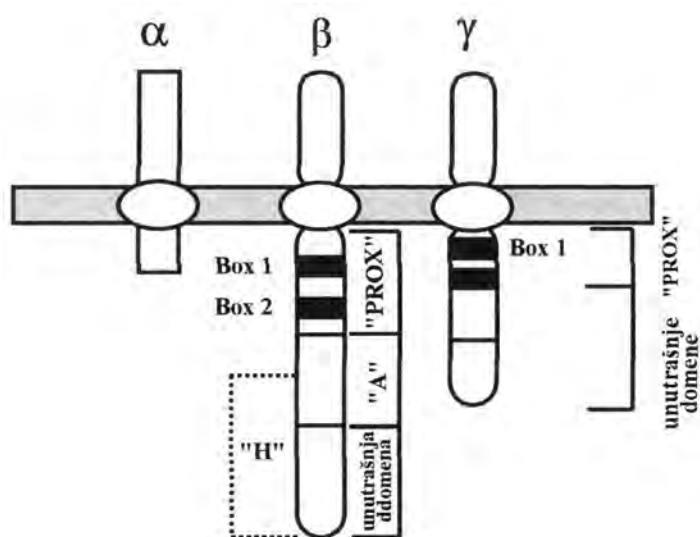
Receptor za IL-2 (Slika 1.1) ne posjeduje unutrašnju enzimatsku aktivnost, ali različite izvršne funkcije stanice ili smrtonosni signal pokreće putem kinaza udruženih sa  $\beta$  i  $\gamma$  lancima receptorskog kompleksa. Naime,  $\alpha$  lanac ima vrlo kratku unutarstaničnu domenu (13 aminokiselina) i ne sudjeluje u provodnji signala u stanicu, ali su za signaliranje odgovorne unutarstanične domene  $\beta$  i  $\gamma$  lanca. Citoplazmatska domena IL-2R $\beta$  lanca podijeljena je u tri dijela (252). Unutarstanični proksimalni dio, smješten neposredno ispod membrane sadrži box 1 i box 2 motive, koji predstavljaju vezna mjesta za JAK 1 kinazu iz porodice Janus kinaza i Src kinazu (Slika 1.2) (252). Srednji dio sastoji se od kiselih amino kiselina i stoga se naziva "A" (od eng. Acid) dio. "A" dio predstavlja vezno mjesto za Src porodicu kinaza (Lck, Fyn i Lyn) (252) i vezno mjesto za Shc adaptorsku molekulu (251), te STAT transkripcijske čimbenike u nekim stanicama (Slika 1.2) (253). Uklanjanje "A" dijela ne zaustavlja proliferaciju posredovanu aktivacijom JAK kinazama ukoliko je očuvan distalniji "H" (od eng. Half) dio (252). "H" dio predstavlja po dužini polovicu unutarstaničnog dijela  $\beta$  lanca, a značajan je, jer aktivira STAT transkripcijske čimbenike (Slika 1.2). Uklanjanje "H" dijela uz očuvanu A regiju ne zaustavlja proliferaciju stanica potaknutu JAK kinazama. Uklanjanje "A" i "H" dijela potpuno onemogućava proliferaciju, stoga se zaključuje da su uključeni u usporedni put signaliranja.

Gama lanac je također podijeljen u tri unutarstanična dijela, od kojih se dio neposredno uz membranu naziva "PROX" dio (Slika 1.1). On pokazuje homologiju sa mnogim SH motivima signalnih bjelančevina, ali je prekratak i ne sudjeluje u signaliranju na način na koji to čine SH signalne bjelančevine. "PROX" dio sadrži box1 motiv koji se udružuje sa JAK 3 kinazom iz porodice Janus kinaza, (254,255), ali "PROX" dio može sudjelovati u

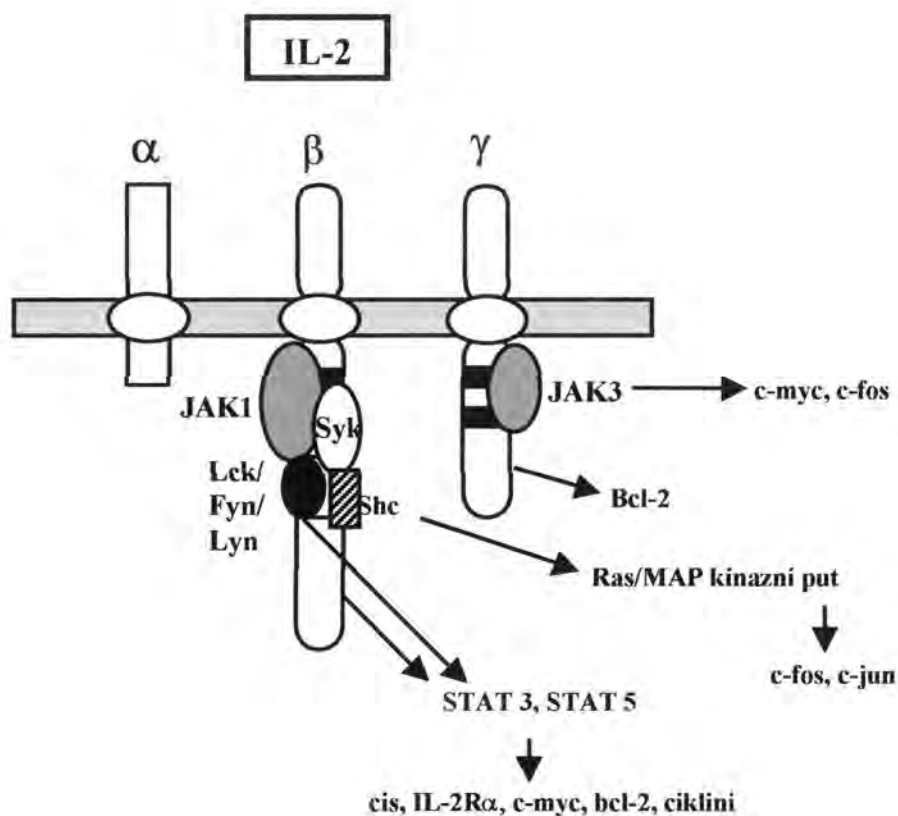


signaliranju neovisno od JAK 3 (Slika 1.2). Janus kinaze vezane za  $\beta$  i  $\gamma$  podjedinice IL-2R (JAK 1 odnosno JAK 3) nekoliko minuta po vezanju IL-2 za receptor fosforiliraju podjedinice na koje su vezane i uzrokuju njihovu heterodimerizaciju (254,256). Na taj način  $\beta$  i  $\gamma$  lanci se približavaju kao i JAK 1 i JAK 3 kinaze vezane na njima, tako da se mogu međusobno aktivirati (254). "PROX" regija pravilno orijentira JAK 3 u odnosu na JAK 1 i tako potiče njihovu međusobnu aktivaciju. Katalitička aktivnost JAK 3 je ključna za poticanje proliferacije putem IL-2R, jer izoforma JAK 3 bez kinazne aktivnosti značajno inhibira proliferaciju i indukciju c-myc i c-fos gena (Slika 1.2) (257). Unutarstanična domena  $\gamma$  lanca neovisno od JAK 3 potiče izražavanje antiapoptotičnog gena bcl-2. Dodatno Janus i druge kinaze udružene sa IL-2 receptorom npr. kinaze porodice Src fosforiliraju tirozinske ostatke i na taj način aktiviraju npr. STAT bjelančevine (Slika 1.2). STAT molekule su latentni transkripcijski čimbenici u nestimuliranim stanicama i smješteni su u citoplazmi. Citokinska stimulacija IL-2 receptora izaziva fosforilaciju receptorskih lanaca i tako se stvara vezno mjesto za signalne bjelančevine sa SH domenom u koje pripadaju i STAT transkripcijski čimbenici. STAT bjelančevine se brzo fosforiliraju, što uzrokuje njihovo udruživanje u homo i heterodimere, koji se prenose u jezgru, gdje se vežu za karakteristične DNA sekvence unutar specifičnog ciljnog gena. IL-2 receptor aktivira STAT 5 i STAT 3 bjelančevine (240,258). Ciljni geni STAT 5 jesu: cis, koji je negativni regulator signaliranja putem drugih citokinskih receptora i IL-2R $\alpha$  lanac (259,260). Fiziološka uloga STAT transkripcijskih faktora nije potpuno definirana, ali se zna da STAT 5 sudjeluje u razvoju NK stanica i TCR  $\gamma^+/\delta^+$  limfocita T. Adaptorske molekule Shc ili Grt 2 vezane za IL-2R  $\beta$  lanac vežu i aktiviraju Ras bjelančevinu. Aktivirana Ras bjelančevina brzo se inaktivira i sama kratkotrajno podržava provodnju signala od receptorskih tirozin kinaza u jezgru. Stoga aktivirana Ras molekula pokreće kaskadne reakcije fosforiliranja serin-treonina na bjelančevinama različitih porodica kinaza, među kojima značajno mjesto zauzima porodica MAP (od eng. Mitogen Activated Protein) kinaza (251). Ove kinaze aktiviraju transkripcijske čimbenike za gene odgovorne za preživljavanje, proliferaciju, aktivaciju stanice i lučenje proupalnih citokina (352) kao npr. c-fos, c-jun, jun B i drugi (251). Wei i suradnici (261) ukazuju na ulogu MAP kinaza u poticanju NK citotoksičnosti posredovane perforinom i granzimima, jer MAP kinaze sudjeluju u pokretanju i izlučivanju zrnaca iz citoplazme NK stanica. Signal se putem IL-2

receptora može prolijediti i adaptorskim molekulama IRS-1 i IRS-2 (od eng. Insulin Receptor Substrate 1 i 2) i signalnim bjelančevinama SHP-1 i SHP-2 (od eng. SH2 Domain- Containing Tyrosine Phosphatases) (254).



**Slika 1.1. Receptor za IL-2.** Prilagođeno iz Nelson BH, Willerford DM. *Biology of the Interleukin-2 receptor.* *Adv Immunol* 1998;70:1-70.



**Slika 1.2. Putovi unutarstaničnog signaliranja preko IL-2R.** Prilagođeno iz Nelson BH, Willerford DM. *Biology of the Interleukin-2 receptor. Adv Immunol 1998;70:1-70.*

#### 1.4.2.1.3. Utjecaj interleukina-2 na citotoksičnost limfocita periferne krvi

Interleukin-2 je snažan stimulator citotoksičnosti mononuklearnih stanica periferne krvi i to limfocita T i NK stanica (16,242). Interleukin-2 može povećati citotoksičnost NK stanica prema NK osjetljivoj i neosjetljivoj staničnoj liniji povećanjem staničnog vezanja i prepoznavanja, što dokazuje ushodna regulacija CD56, CD54 i CD11a molekula na NK

stanicama periferne krvi stimuliranih s IL-2 (262). Međutim, IL-2 povećava egzocitozu perforina i serinskih esteraza putem aktivacije CD16 molekule. Uklanjanje CD16<sup>+</sup> stanica periferne krvi antitijelima i komplementom, ukida citotoksičnost IL-2 stimuliranih CD3<sup>-</sup> NK stanica protiv K-562 stanične linije. Slično se uočilo i u CD3<sup>+</sup> limfocita T, iako oni u manjoj mjeri izražavaju CD16 molekulu. Zrnca citotoksičnih limfocita posjeduju perforin i granzime, te je više istraživača proučavalo učinak IL-2 na izražavanje perforina na razini prepisivanja (66,82,83,262,263,264). CD3<sup>+</sup> limfociti T periferne krvi čovjeka, stimulirani IL-2 kroz 4 sata, pokazuju četverostruki porast glasničke RNA za perforin u odnosu na nestimuliranu kontrolu, a najveće povećanje (7-8 puta) se postiže nakon šest sati (265). Populacija obogaćena CD8<sup>+</sup> limfocitima T, pokazuje deset puta veće izražavanje glasničke RNA za perforin nego CD4<sup>+</sup> T limfocitna subpopulacija nakon stimulacije IL-2 (265). To upućuje da IL-2 u dozi od 200-1000 i.j./ml ima neznatne učinke na sintezu glasničke RNA za perforin u CD4<sup>+</sup> stanicama (265). Slično je zapaženo s NK stanicama periferne krvi CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> fenotipa, koje konstitutivno izražavaju visoku količinu glasničke RNA za perforin, ali se njezin sadržaj ne može dodatno povećati stimulacijom s IL-2 *in vitro* (265). Suprotno tome, Clement i suradnici (263) dokazali su slabiji porast izražavanja glasničke RNA za perforin i granzim A i B (0,4 -1x) u NK stanicama periferne krvi šest sati nakon stimulacije s 200 i.j./ml IL-2. Mori i suradnici (266) su također dokazali porast glasničke RNA za perforin u NK stanicama po stimulaciji s IL-2. Razlog za slabiji učinak IL-2 na izražavanje perforina u NK stanicama nego T limfocitima je posljedica puno slabije konstitutivne izraženosti  $\alpha$  lanca IL-2 receptora na NK stanicama u odnosu na T limfocite (240). Međutim, prisutnost  $\beta$  i  $\gamma$  podjedinice IL-2 receptora na NK stanicama intermedijarnim afinitetom veže IL-2 i posreduje učinke IL-2 na NK stanicama, ali u puno manjem obimu nego na limfocitima T. Pored utjecaja na glasničku RNA za perforin IL-2 povećava izražavanje perforin proteina u splenocitima miša i NK stanicama periferne krvi u ljudi (83,93).

Osim utjecaja na perforin IL-2 utječe na izražavanje FasL na membrani NK stanica periferne krvi, koji se zatim i otpušta u medij (61,96). Naime, svježe izolirane humane NK stanice konstitutivno izražavaju FasL u svojoj citoplazmi, što je dokazano imunoblotom (96). Kashii i suradnici (267) ističu da svježe izolirane NK stanice periferne krvi mogu ubiti FasL različite tumorske linije, ali u kombinaciji s drugim citotoksičnim molekulama

TNF glavne porodice bjelančevina. To znači da nestimulirane humane NK stanice periferne krvi, ipak izražavaju i na svojoj površini FasL u manjoj količini (67). Međutim, izražavanje funkcionalnih molekula FasL na NK stanicama periferne krvi se znatno povećava po stimulaciji s IL-2, jer tada one u direktnom kontaktu jače ubijaju Fas<sup>+</sup> Raji staničnu liniju u odnosu na nestimuliranu kontrolu (268).

Johansen i suradnici (268) su pokazali da zrele svježe izolirane nestimulirane NK stanice periferne krvi izražavaju na svojoj površini TRAIL izvršnu molekulu citotoksičnosti, te da njeno izražavanje ushodno regulira IL-2. Interleukinom-2 stimulirane CD3<sup>+</sup> NK stanice periferne krvi koriste TRAIL kao brzi citolitički mehanizam u lizi ciljnih Jurkat stanica (2687). Citotoksičnost posredovana TRAIL u ovim pokusima bila je čak brža od citotoksičnosti posredovane FasL (268). TRAIL, slično kao i FasL može svoju aktivnost ostvariti u topljivom obliku (96). Dokaz za to je da T limfociti periferne krvi i Jurkat stanična linija po stimulaciji s fitohemaglutininom luči TRAIL molekulu u supernatant, koja posjeduje citotoksička svojstva i može ubiti nestimulirane Jurkat stanice (96). Međutim, za sada nema podataka da li IL-2 stimulirane NK stanice luče TRAIL u supernatant. Slično kao humane NK stanice i mišji CD3<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> splenociti povećavaju TRAIL posredovanu citotoksičnost protiv L929 stanične linije (107).

Nadalje, humane svježe izolirane NK stanice periferne krvi konstitutivno izražavaju TNF $\alpha$  na svojoj membrani (269) i luče topljivi oblik ove citotoksičke molekule molekularne težine 17kD (270). Stimulacija s IL-2, IL-15 i IL-18 ushodno regulira izražavanje glasničke RNA za TNF $\alpha$ , kao i TNF $\alpha$  protein na NK stanicama (270). Iz toga proizlazi da NK stanice periferne krvi osim perforina posjeduju izvršne molekule citotoksičnosti TNF glavne porodice bjelančevina kao što su FasL, TRAIL, limfotoksin LT3, CD27L, CD30, OX40L, 4-1BBL kojima također posreduju citotoksičnost prema različitim tumorskim linijama (264,267,268,270). Drži se da se mehanizam apoptoze tumorskih stanica pokreće simultanom aktivacijom barem triju apoptotičkih molekula iz TNF porodice bjelančevina (267).

#### *1.4.2.1.4. Izražavanje interleukina-2 na materno-fetalnom spoju*

U lizatu mišje decidue od 8-12 dana trudnoće RT-PCR tehnikom, nije dokazana glasnička RNA za IL-2 kao ni glasnička RNA za IL-2R $\alpha$  lanac, za razliku od znatno veće količine

glasničke RNA za IL-2R  $\beta$  i  $\gamma$  lance (39). U humanoj decidui normalne trudnoće nije izražen IL-2R $\alpha$  lanac na membranama svježe izoliranih decidualnih stanica (271). Kurahayasi i suradnici (271) utvrdili su da CD56<sup>+</sup> decidualne stanice već nakon kraće kulture *in vitro* izražavaju  $\alpha$  i  $\beta$  lance tj. IL-2 receptor visokog afiniteta. Slično tome, 100% decidualnih NK staničnih klonova izražava  $\alpha$  lanac IL-2 receptora (272). Bez obzira na izražavanje IL-2 receptora, dvojbeno je da li IL-2 ima učinke *in vivo* u regulaciji citotoksičnosti decidualnih limfocita. Naime, u normalnoj trudnoći u ljudi i glodavaca stvaranje IL-2 je smanjeno višestrukim mehanizmima npr. putem progesterona, IL-4, PGE (2,273,274), te se decidua smatra tkivom s funkcionalnim nedostatkom IL-2. *In vitro*, IL-2 dodan u suspenziju decidualnih mononuklearnih stanica ushodno regulira glasnička RNA za perforin i perforin protein u decidualnim limfocitima (275). Decidualni limfociti stimulirani s IL-2 u koncentraciji od 1000 i.j./ml tijekom 18 sati pojačano liziraju K-562 stanice u odnosu na nestimuliranu kontrolu (276). Manje koncentracije IL-2 (100 i.j./ml) također dodane u suspenziju decidualnih mononuklearnih stanica ne povećavaju citotoksičnost decidualnih limfocita prema K-562 ciljnim stanicama (276). Međutim, pročišćene humane decidualne NK stanice, stimulirane s 50 i.j./ml IL-2 tijekom 24 sata pokazuju značajno veću citotoksičnost prema K-562 staničnoj liniji u odnosu na nestimuliranu kontrolu (60). Iste stanice *in vitro* stimulirane 3 dana sa 100 i.j./ml IL-2 još više povećavaju citotoksičnost prema K-562 stanicama i postaju citotoksične prema stanicama svježe izoliranog ekstraviloznog trofoblasta i koriokarcinomskoj staničnoj liniji JEG-3, koja izražava HLA-G molekulu, za razliku od nestimuliranih stanica, koje to nisu u mogućnosti (55). Dakle, IL-2 snažno stimulira LAK aktivnost decidualnih stanica, za razliku od IL-15 koji u koncentraciji od 5 ng/ml tijekom 3 dana povećava citotoksičnost pročišćenih decidualnih CD56<sup>+</sup> stanica protiv K-562 stanične linije i djelomično protiv JEG-3 HLA-G<sup>+</sup> koriokarcinomske linije, ali nije u mogućnosti povećati citotoksičnost prema svježe izoliranom ekstraviloznom trofoblastu (55).

U pokusima na životinjskim modelima pokazalo se da davanje IL-2 normalnim trudnim mišićima dovodi do pobačaja (277). Raghupathy i suradnici (278) su pokazali znatno veću razinu izražaja IL-2 u posteljicama mišića sklonim imunološki posredovanim gubicima ploda u odnosu na posteljice normalne trudnoće, te opisuju da bi snažna Th1 stanicama posredovana anti-fetalna reakcija u ljudi mogla biti uzrok pobačaja ploda (279).

## 1.4.2.2. Interleukin 12

### 1.4.2.2.1. Struktura interleukina-12

Interleukin 12 (IL-12) je izoliran iz B stanične linije transformirane Epstein Barr-ovim virusom (EBV-BCL) (280). Biološki aktivan sastoji se od dvije podjedinice p40 i p35. Glasničke RNA za obje podjedinice IL-12 sadrže destabilizirajući slijed nukleotida, koje se ne prevode u protein, ali određuju poluvijek glasničke RNA za podjedinice u citoplazmi (281). Western blot analizom utvrđeno je nekoliko izoformi različitih molekularnih težina koje su reagirale sa anti-p40 odnosno anti-p35 antitijelima (282). Naime, p40 i p35 imaju četiri odnosno tri glikozilacijska mjesta. Podjedinica p35 ima strukturu  $\alpha$  uzvojnice i sačuvani odsječak aminokiselina, koji pokazuje sličnosti u glodavaca i ljudi (283). Podjedinica p40 pripada glavnoj porodici receptora za hematopoetske citokine i pokazuje sličnosti sa izvanstaničnom domenom receptora za IL-6 (284). Unutar p40 bjelančevinastog lanca stvaraju se četiri disulfidna mosta, a unutar p35 tri. Jedan disulfidni most između citokinskih ostataka jednog i drugog lanca povezuju dvije podjedinice u heterodimer, koji se luči i izražava biološku aktivnost (281). Za ostvarivanje biološke aktivnosti nije potrebno vezanje p40 i p35 podjedinice u IL-12 heterodimer, nego istovremeno vezanje p35 i p40 podjedinice za receptor IL-12 (IL-12R) (285). Nadalje, molekule monomera p40 mogu se nevezane sa p35 izlučivati iz mišjih i humanih stanica, što nije svojstvo monomera p35. Izvan stanica monomeri p40 podjedinice udružuju se u dimer ili trimer, ali ne ostvaruju u ljudi biološku aktivnost IL-12 (286). Štoviše, dimer p40 *in vitro* može čak spriječiti vezanje IL-12 heterodimera obilježenog radioaktivnim jodom na staničnoj liniji koja izražava receptor za IL-12. Supernatant stanica glodavaca transfeciranih s genom za p40 podjedinicu IL-12, koji sadržava p40 podjedinicu koči biološku aktivnost IL-12 heterodimera i predstavlja svojevrsan antagonist IL-12 *in vitro* i *in vivo* (287). Za života u miša se konstitutivno 20% cirkulirajuće p40 podjedinice nalazi u obliku homodimera, a udio ovog oblika p40 podjedinice može se povećati stimulacijom lipopolisaharidima (288). Ubrizgavanjem u miša 40 mg rekombinantne p40 bjelančevine glodavaca u obliku homodimera značajno smanjuje stvaranje IFN $\gamma$  potaknuto LPS, a potiskuje se Th1 imunološki odgovor i njime podržavane reakcije preosjetljivosti (288). Naime, IL-12 glavni je čimbenik koji diferencira naivne CD4<sup>+</sup> limfocite T u stanice Th1 fenotipa uz snažno poticanje lučenja IFN $\gamma$  (289), te umjereno poticanje lučenja GM-CSF,

TNF- $\alpha$  i IL-8 u T i NK stanicama i nakupljanje glasničke RNA za M-CSF u NK stanicama (242). U ljudi p40 homodimer ima malu ili nikakvu sposobnost uklanjanja učinaka IL-12, iako se može lučiti *in vitro* i *in vivo* čak u 100 puta većim koncentracijama od IL-12 heterodimera (286). Međutim za p35 podjedinicu IL-12, osim p40, može se vezati bjelančevina molekularne težine 25 kD, koja pokazuje 27% sličnosti sa p40, a izdvojena je iz limfocita B inficiranih Epstein Barr virusom i stoga nazvana EBI 3 (od eng. Epstein Barr Virus Induced Protein 3) (290). Kasnije je utvrđena konstitutivna izraženost iste bjelančevine u humanim posteljicama (290). Zbog visokog stupnja homologije EBI 3 sa p40 podjedinicom IL-12, stanice kotransfecirane sa cDNA za p35 i EBI3 luče kompleks obiju lanaca vezanih nekovalentnim vezama koji se ne može vezati za receptor za IL-12, ali ima funkciju poput hematopoetina (291). Kako humani trofoblast stvara velike količine p35 koji se koimunoprecipitira s EBI 3, zaključuje se da p35 podjedinica i EBI 3 čine heterodimere *in vivo* (291), te je moguće da EBI 3 djeluje kao antagonist u stvaranju djelotvornog IL-12 heterodimera u decidui zdravih trudnoća.

#### 1.4.2.2.2. Receptor za interleukin-12

Receptor za IL-12 sastoji se od dva bjelančevinasta lanca, koji svaki za sebe čini podjedinicu: IL-12 R $\beta$ 1 odnosno ILR $\beta$ 2 (292). Monoklonska antitijela usmjerena protiv IL-12R $\beta$ 1 specifično uklanjaju funkciju IL-12, te je taj lanac neophodan za funkciju receptora za IL-12 (292). Međutim, ovaj lanac nije dovoljan za provodnju signala u stanicu (292) i IL-12R $\beta$ 1 deficijentan miš ne može odgovoriti na IL-12 (293). Za unutarstanično signaliranje potreban je IL-12R $\beta$ 2, koji istovremeno tvori, udružen sa IL-12R $\beta$ 1 lancem, visokoafinitetni receptor za IL-12 (294). IL-12R $\beta$ 1 lanac veže p40 podjedinicu, dok  $\beta$ 2 veže p35 ili strukturu izraženu na heterodimeru. Dinamika izražavanja receptora za IL-12 odražava sposobnost stanice da odgovori na stimulaciju IL-12. Svega 10-20% nestimuliranih LPK konstitutivno izražava receptor za IL-12 uključujući prvenstveno NK stanice, a tek neznatno limfocite T (292). Iako niska, izraženost receptora za IL-12 dovoljna je da omogući početno djelovanje IL-12 u smislu poticanja sinteze glasničke RNA za IFN $\gamma$  (295). Stimulacija s antigenom, PMA, anti-CD3 antitijelima, kombinacijom anti-CD3 i anti-CD28 antitijelima tijekom 2-4 dana ushodno regulira izražavanje receptora



za IL-12 na limfocitima periferne krvi (295). Aktivirane T i NK stanice posjeduju glasničku RNA za IL-12R $\beta$ 1 lanac (292). IL-12R $\beta$ 1 izražavaju čak i limfociti B, ali ne vežu IL-12, jer ne posjeduju  $\beta$ 2 lanac (296). Regulacija izražavanja  $\beta$ 2 podjedinice je ključna u diferencijaciji CD4<sup>+</sup> limfocita T u Th1 ili Th2 stanice, jer IFN $\gamma$  ushodno, a IL-4 nishodno regulira izražavanje IL12R $\beta$ 2 lanca. Samo Th1, ali ne i Th2 stanični klonovi posjeduju cjeloviti receptor za IL-12 (297).

Provođenje signala putem receptora za IL-12 uključuje brzu fosforilaciju tirozina na JAK 2 i Tyk 2 kinazama (298). Fosforilacija Tyk 2 po stimulaciji IL-12 je zabilježena samo u stanicama koje izražavaju  $\beta$ 1 citoplazmatsku domenu, a fosforilacija JAK 2 u stanicama koje izražavaju  $\beta$ 2 citoplazmatsku domenu (299). Fosforilacija navedenih kinaza aktivira STAT porodicu transkripcijskih čimbenika: STAT 1, STAT 3 i STAT 4, koji međusobno tvore homo ili heterodimere (298). Aktivacija STAT 4 interleukinom-12 je od posebnog interesa, jer se ovaj transkripcijski čimbenik u ljudi ne aktivira drugim citokinima, izuzev IFN $\alpha$  (300). Stoga aktivacija STAT 4 predstavlja specifičan ili gotovo specifičan biološki odgovor na IL-12. T i NK stanice iz STAT 4 deficijentnog miša ne odgovaraju na stimulaciju IL-12 povećanom produkcijom IFN $\gamma$ , što ukazuje na izravnu uključenost STAT 4 u poticanju prepisivanja IFN $\gamma$  gena (301).

#### 1.4.2.2.3. Izvor i regulacija lučenja interleukina-12

Glavni fiziološki izvor IL-12 jesu fagocitne stanice (285). Monociti *in vitro* luče p40 podjedinicu i IL-12 heterodimer po stimulaciji LPS, ali uvijek u manjoj količini od količine izlučene u kulturi sveukupnih mononuklearnih stanica periferne krvi, što ukazuje da limfociti doprinose lučenju IL-12, pogotovo tijekom infekcije (302). Regulacija lučenja IL-12 na fagocitima se odvija dvojako: neovisno o T limfocitima kada mikroorganizmi i njihovi produkti stimuliraju fagocite na lučenje IL-12 (302) ili ovisno o limfocitima T kada se vezanjem CD40L (na limfocitima T) i CD40 molekule (na fagocitima) potiče lučenje IL-12 i podržava Th1 imunološki odgovor (303). IL-12 snažno pojačava lučenje i sintezu glasničke RNA za IFN $\gamma$  u NK stanicama, te u CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>,  $\alpha/\beta$ <sup>+</sup> ili  $\gamma/\delta$ <sup>+</sup> limfocitima T (295). Najveće količine glasničke RNA za IFN $\gamma$  zabilježene su u aktiviranim limfocitima T 2-4 sata, a u neaktiviranim T i NK stanicama 18-24 sata po stimulaciji s IL-12 (295). U

poticanju lučenja IFN $\gamma$ , IL-12 iskazuje aditivni ili sinergistički učinak s drugim čimbenicima: IL-2, PMA (295), anti-CD3, anti-CD16, anti-CD28 antitijelima i lektinima (304). Antigen prezentirajuće stanice kao izvori TNF $\alpha$  i IL-13, te nosioci B7 i CD58 molekula važni su kostimulatori lučenja IFN $\gamma$  u odgovoru na IL-12 (295). IFN $\gamma$  mehanizmom pozitivne povratne sprege snažno pojačava lučenje IL-12 iz monocita (305). Ovaj mehanizam povratne sprege između IL-12 i IFN $\gamma$  je potencijalno opasan i mogao bi voditi u nekontroliranu proizvodnju citokina i mogući šok. U obrani od mogućeg oštećenja organizma interleukinom-12 sudjeluju citokini Th2 imunološkog odgovora: IL-4, TGF $\beta$  i pogotovo IL-10 (306). Oni sprječavaju lučenje IL-12 i drugih Th1 citokina (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-13), čije lučenje nastaje po stimulaciji T i NK stanica IL-12 (306). Th2 citokini koče izražavanje receptora za IL-12 na limfocitima T (307), te potiskuju izražavanje navedenih kostimulacijskih molekula na predočnim stanicama (306), što neizravno smanjuje učinke IL-12. Međutim, IL-10 ne može ukloniti učinke IL-12 na NK stanicama koje posjeduju IL-12R (306). Zanimljiva je i činjenica da IL-12 može potaknuti *in vitro* i *in vivo*, T stanične klonove periferne krvi na lučenje IL-10, što ukazuje da IL-12 sam može potaknuti lučenje svojih stimulatora i inhibitora (308).

#### 1.4.2.2.4. Utjecaj interleukina-12 na citotoksičnost

Kao što je opisano pod prethodnim naslovom, IL-12 snažno potiče lučenje IFN $\gamma$  i Th1 citokina putem kojih podržava stanicama posredovan imunološki odgovor. Miševi s oštećenim genom za IL-12 imaju samo umjereno sniženu NK citotoksičnost, što ukazuje da IL-12 nije od primarne važnosti za poticanje citotoksičnosti NK stanica, te da drugi citokini mogu nadomjestiti njegovu ulogu (309). U ljudi IL-12 potiče stvaranje kolonija granulocita, makrofaga i eritrocita, ali ne i NK stanica (310) iz najprimitivnijih stanica matica (311). IL-12 utječe na razvoj T limfocita u timusu (312), ali ne može sam izazvati proliferaciju neaktiviranih limfocita T periferne krvi, bez kostimulacije s fitohemaglutininom ili forbol-miristat-acetatom (313). Međutim, IL-12 potiče proliferaciju alostimuliranih CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfocita kao i prethodno aktiviranih NK stanica (313). Kostimulacija navedenih limfocita T i NK stanica s IL-12 i IL-2 povećava njihov proliferacijski odgovor u odnosu na stanice stimulirane samo jednim citokinom (313).

Moguće da se sinergizam ovih dvaju citokina ostvaruje na uzajamnom poticanju izražavanja receptora. Dokazano je da IL-2 potiče izražavanje receptora za IL-12, a IL-12 potiče izražavanje receptora za IL-2 (307). Interleukin-12 potiče nastanak LAK stanica iz humanih limfocita periferne krvi (porijeklom iz T i NK stanica) u prisutnosti hidrokortizona (314). Hidrokortizon uklanja endogeno lučenje citokina, posebno IL-2, te se na taj način želio utvrditi učinak samog IL-12 na citotoksičnost limfocita periferne krvi. U odsutnosti hidrokortizona IL-12 sam izazove LAK aktivnost mehanizmom ovisnim o TNF- $\alpha$  (314). Stimulacija limfocita periferne krvi IL-12, već nakon nekoliko sati povećava NK staničnu citotoksičnost protiv NK osjetljive K-562 stanične linije eritroleukemije, ali također i NK neosjetljivih ciljnih stanica, od kojih su neke i inficirane virusom (315). Povećanje citolitičke aktivnosti NK stanica preinkubiranih s IL-12 obično je manje nego citolitička aktivnost istih stanica preinkubiranih s IL-2, a usporediva je sa citotoksičnošću postignutom sa IFN $\alpha$  (316). IL-12 povećava citotoksičnost humanih NK stanica već u koncentraciji 10 pM, dok IL-2 i IFN $\alpha$  najveći učinak postižu u koncentracijama većim od 1 nM. Ta osjetljivost neaktiviranih NK stanica na IL-12 ne začuđuje, jer one konstitutivno izražavaju receptor za IL-12 (292), a IL-12 na neposredan način, bez kostimulacijskih signala iz akcesornih stanica, učinkovito potiče ushodnu regulaciju receptora za IL-12 (315,316) i brzo čini te stanice još osjetljivijim na IL-12. Povećanje citotoksičnosti interleukinom-12 stimuliranih NK staničnih klonova periferne krvi povezano je s povećanim izražavanjem adhezijskih molekula (CD2, ICAM, LFA-1), aktivacijskog biljega CD69 (73,262) i dvostrukog povećanja količine glasničke RNA za perforin i granzim B, već nakon nekoliko sati stimulacije (242). Nije uočen sinergizam niti aditivni učinak IL-12 i IL-2 u izražavanju glasničke RNA za perforin (242). Međutim, neovisno o poticanju sinteze perforina, dobro je poznat sinergizam IL-12 i IL-2 u brznoj aktivaciji NK stanica periferne krvi i povećanju njihove citotoksičnosti, uglavnom povećanjem mobilizacije i egzocitoze preformiranih citolitičkih medijatora iz zrnaca mehanizmom ovisnim o kalciju i/ili aktivaciji protein kinaze C (262,317). Snažno pražnjenje zrnaca, praćeno je promjenom izgleda citoplazmatskih zrnaca sa elektron gustim središtem u zrnca različita oblika, što također ukazuje na staničnu aktivaciju. Interleukin-12 povećava izražavanje membranskog TRAIL na NK stanicama jetre, pluća i slezene *in vitro* i smanjuje rast jetrenih i plućnih metastaza u miša *in vivo* (291).

#### 1.4.2.2.5. Uloga i zastupljenost interleukina-12 na materno-fetalnom spoju

Lučenje IL-12 i izražavanje obiju podjedinica IL-12 receptora nishodno se regulira Th2 citokinima (306,307), stoga se vjeruje da prevladavanje IL-4 IL-10 i TGF $\beta$  tijekom trudnoće u perifernoj krvi, a osobito u decidui predstavlja djelotvoran mehanizam za uklanjanje biološke funkcije IL-12. To potkrepljuje nalaz jednakomjerno male količine glasničke RNA za IL-12 tijekom trudnoće u deciduama miša i ne može se povezati sa dinamikom izražavanja glasničke RNA za perforin (39). Međutim, prisustvo male količine glasničke RNA za IL-12 istovremeno ukazuje da bi se u slučaju potrebe u decidui moglo brzo stvoriti potrebna količina IL-12 bjelančevine. Hayakawa i suradnici (318) su pokazali da humani limfociti periferne krvi i decidualne mononuklearne stanice stimulirane 48 sati sa 10 i.j. IL-12 postaju citotoksične prema trofoblastu, te koriokarcinomskim staničnim linijama JAR (HLA-G<sup>-</sup>) i JEG-3 (HLA-G<sup>+</sup>) u odnosu na nestimulirane mononuklearne stanice krvi i decidue koje ne mogu lizirati navedene ciljeve u 4 satnom testu citotoksičnosti mjenom na temelju otpuštanja laktoza-dehidrogenaze (LDH) (318). RT-PCR reakcijom se utvrdio porast glasničke RNA za granzim B i FasL 12 sati po stimulaciji limfocita periferne krvi, odnosno 4 sata po stimulaciji decidualnih mononuklearnih stanica, a razina glasničke RNA za perforin je ostala nepromjenjena (318). Moguće da bi porast koncentracije IL-12 *in vivo* u decidui uzrokovao odbacivanje ploda. U trudnica s preeklampsijom u 36 tjednu trudnoće utvrđen je porast Th1 limfocita u perifernoj krvi CD4<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> fenotipa (272) uz porast koncentracije IL-12 u plazmi u odnosu na zdrave trudnice (65).

#### 1.4.2.3. Interleukin-15

##### 1.4.2.3.1. Osobitosti građe interleukina-15 i njegova receptora

Interleukin-15 je glikoprotein molekularne težine 14-15 kD kloniran iz epitelne stanične linije majmuna 1994. god. (248,319). Početna istraživanja su pokazala da ovaj citokin dijeli puno bioloških aktivnosti sa IL-2. Oba citokina stimuliraju proliferaciju i diferencijaciju T, B, NK i LAK stanica, te proizvodnju antitijela iz plazma stanica (320,321,322). Nadalje, oba citokina potiču izražavanje citolitičkih medijatora (perforina, serinskih esteraza i FasL) i citolitičku aktivnost T, NK i LAK stanica (320,323). Kemotaksijski djeluju na T limfocite

i NK stanice, jer potiču izražavanje adhezijskih molekula na njihovoj površini (324,325). Međutim, novijim istraživanjima sve se više uočavaju razlike između ovih citokina u regulaciji imunološkog odgovora. Ponajprije IL-2 je isključivo proizvod aktiviranih T limfocita, dok je IL-15 u ljudskom organizmu daleko rasprostranjeniji i nalazimo ga u gotovo svim tkivima. Stoga je i utjecaj IL-15 na imunološke funkcije sveobuhvatniji, nego utjecaj IL-2. Iako su IL-2 i IL-15 članovi iste porodice citokina sa 4 uzvojnice, njihova primarna struktura ne pokazuje veće sličnosti (319). Međutim, oba citokina imaju sličnu konformaciju (319,326). Time se djelomično može objasniti da su  $\beta$  i  $\gamma$  podjedinice receptora za IL-15 posve jednake s istoimenim podjedinicama receptora za IL-2, a potrebne su za posredovanje bioaktivnosti kako IL-15, tako i IL-2 (327, 328). Naime,  $\beta$  podjedinica ima dug unutarstanični dio sastavljen od 286 aminokiseline i služi za prijenos signala u stanicu. Pored zajedničkih  $\beta$  i  $\gamma$  lanaca receptori za IL-2 i IL-15 posjeduju specifične  $\alpha$  lance koje visokim afinitetom vežu samo jedan od dva navedena citokina (329). Zanimljivo je da IL-2R $\alpha$  i IL-15R $\alpha$  lanac međusobno pokazuju homologiju (250). Međutim, vrlo ograničena raspodjela IL-2R $\alpha$  lanca na aktiviranim limfocitima T ukazuje da je signaliranje putem receptora za IL-2 jedinstveno za stečeni imunitet posredovan limfocitima T, dok široka rasprostranjenost IL-15R $\alpha$  ukazuje na znatno širu ulogu IL-15 u različitim vrstama stanica. Interleukin-15R $\alpha$  izražen je na mitogenom aktiviranim makrofagima, limfocitima T, NK stanicama, staničnim linijama timusa i linijama porijeklom iz koštane srži (330), decidualnim limfocitima (55). Glasnička RNA za IL-15R $\alpha$  šire je rasprostranjena od prevedene forme (bjelančevine), a dokazana je u različitim tkivima: jetra, srce, slezena, pluća, poprečno-prugasta muskulatura, aktivirani endotel (248). IL-2, anti- CD3 antitijela i PMA ushodno reguliraju izražavanje glasničke RNA za IL-15R $\alpha$  u limfocitima T, a IFN $\gamma$  ima isti učinak na makrofagima (248). Opisani receptor za IL-15 koji se sastoji od  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  podjedinice nazvan je receptor za IL-15 tip I. Receptor za IL-15 tip I nije jedini receptor putem kojeg se ostvaruje aktivnost IL-15. Mišji i humani mastociti ne proliferiraju u odgovoru na velike doze IL-2, ali proliferiraju u prisutnosti IL-15 (331). Za taj učinak nije neophodna prisutnost  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice receptora za IL-15 tipa I, jer se na mastocitima IL-15 veže za receptor tipa II (331,332). Uunutrašnji put signaliranja receptora za IL-15 tipa II razlikuje se od signaliranja klasičnog receptora tipa I

na limfocitima T (331). IL-15 na T limfocitima izaziva fosforilaciju JAK 1 i JAK 3 kinaze, dok se na mastocitima prvenstveno fosforilira JAK 2 kinaza (331).

#### 1.4.2.3.2. Izvori i uloga interleukina-15

Glasnička RNA za IL-15 je široko rasprostranjena i nalazi se u posteljici, plućima, mišićima, bubrezima, fibroblastima, epitelnim stanicama, te stromalnim stanicama timusa i koštane srži. Drži se da većina tih stanica u odgovarajućim fiziološkim okolnostima može stvarati i lučiti IL-15 (319,333). Tako mišićne, epitelne i aktivirane dendritičke stanice izražavaju i luče IL-15, a limfociti koji se nađu u blizini tih tkiva koriste IL-15 za svoje održavanje i nagomilavaju se u nelimfoidnoj stromi (319,333, 334,335). IL-15 sinergistički s IL-12 inducira proliferaciju mišjih Th1 klonova (336), a u ljudi aktivira Th1 staničnu subpopulaciju limfocita T (334). Međutim, postoje dokazi da IL-15 potiče i Th2 citokinsku produkciju u limfocitima T. Humani T stanični klon specifičan za *Dermatophagoides farinae* II (alergen iz kućne prašine) luči više IL-5 po stimulaciji s IL-15 (337). Glasnička RNA za IL-5 utvrdila se već tri sata nakon stimulacije s IL-15, a najizraženija je bila nakon devet sati stimulacije. Interleukinom-15 potaknuta sinteza IL-5 u cjelosti je bila uklonjena inhibitorima kinaza (herbamicinom A), što dokazuje uključenost tirozin kinaza u proizvodnju signala za sintezu IL-5 (337). Stvaranje IL-5 iz T stanica periferne krvi može se ukloniti neutralizirajućim antitijelom protiv IL-2, međutim IL-15 potiče lučenje IL-5 usprkos učinkovitoj neutralizaciji IL-2 (337). Ovi rezultati ukazuju da se IL-15 ne može nedvojbeno svrstati niti u Th1 niti u Th2 skupinu citokina. Jedinствена uloga IL-15 *in vivo* postala je jasnija nakon istraživanja provedenih na IL-15<sup>-/-</sup> deficijntnim miševima (338) i IL-15R $\alpha$ <sup>-/-</sup> deficijntnim miševima (339). Dok su se u IL2<sup>-/-</sup> i IL2R $\alpha$ <sup>-/-</sup> deficijntnom mišu spontano akumulirali aktivirani T i B limfociti i miševi su umirali prerano, IL-15<sup>-/-</sup> i IL-15R $\alpha$ <sup>-/-</sup> miševi su bili općenito zdravi, ali su im nedostajale NK stanice, intestinalno stvorene subpopulacije intraepitelijalnih limfocita i aktivirani CD8<sup>+</sup> T limfociti (338,339). Studije na IL-2R $\alpha$  i IL-2/15R  $\beta$  i  $\gamma$  deficijntnim miševima (od kojih samo posljednjima nedostaju signali provedeni putem IL-15) ukazuju da IL-15 *in vivo* potiče razvoj i diferencijaciju NK T stanica u timusu i crijevnom epitelu (326,340,341). *In vitro*, IL-15 stimulira proliferaciju mišjih CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> limfocita T (319), kao i stanica s pamćenjem CD8<sup>+</sup> fenotipa (342). Nadalje, IL-15 je fiziološki čimbenik proliferacije i

diferencijacije NK stanica u glodavaca i ljudi (343,344). *In vitro* istraživanja na humanim CD34<sup>+</sup> prekursorskim hematopoetskim stanicama pokazuju da se CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK stanice mogu razviti iz CD34<sup>+</sup> stanica u prisustvu IL-2 i alogenskih stanica hraniteljica, ali ne i bez njih (343). Međutim, CD34<sup>+</sup> stanice mogu *in vitro* proliferirati i diferencirati se u NK stanice nakon 21 dan kulture u mediju sa IL-15 (243). Većina tako diferenciranih stanica nije izražavala CD2, niti CD16 molekulu, ali je izražavala CD3 zeta lanac T staničnog receptora u svojoj citoplazmi, slično zrelim NK stanicama periferne krvi. Nadalje, intaktna stroma koštane srži proizvodi IL-15 da podrži NK staničnu diferencijaciju (344,345). Slično tome, NK stanice se normalno razvijaju u miša kome nedostaje gen za IL-2 ili je funkcija IL-2 uklonjena ciklosporinom, međutim ne mogu se razviti u nedostatku normalne koštane srži, koja je izvor IL-15. U miša s funkcionalnim nedostatkom IL-15 zakočeno je umnožavanje, sazrijevanje i litička aktivnost NK stanica prema NK osjetljivoj liniji (YAC), te podsjećaju na nezrele NK1.1<sup>+</sup> stanice iz neonatalnog ili fetalnog miša. Nakon *in vitro* stimulacije splenocita miša s afunkcionalnom koštanom srži, s IL-15 nezrele NK 1.1<sup>+</sup> stanice proliferiraju, stječu litičku aktivnost i fenotip zrelih NK1.1<sup>+</sup> stanica (B220<sup>+</sup>, Ly 49<sup>+</sup> i CD11b<sup>+</sup>) (243). IL-2 također aktivira nezrele NK1.1<sup>+</sup> mišje splenocite, jer izražavaju  $\beta$  i  $\gamma$  podjedinicu receptora za IL-2, ali je daleko manje učinkovit od IL-15, te se učinak postiže s 10-50 puta većom koncentracijom od koncentracije IL-15. Kayagaki i suradnici (107) su pokazali da splenociti Balb/c miša stimulirani 6 dana sa 100 ng/ml IL-15 ushodno reguliraju izražavanje TRAIL i FasL na svojim membranama, kao i citolitičku aktivnost prema L929 staničnoj liniji. Testiranje citolitičke aktivnosti splenocita stimuliranih s IL-15 prema L929 stanicama pokazalo je da ove stanice koriste tri glavna do sada poznata kratkoročna mehanizma citotoksičnosti: perforin, FasL i TRAIL (107). Naime, citolitička aktivnost IL-15 stimuliranih splenocita prema L929 stanicama značajno se smanjila u prisutnosti concanamycina A, što ukazuje na uključenost perforina u citolizi ciljnih stanica. U prisustvu concanamycina A i anti-FasL antitijela citolitička aktivnost IL-15 stimuliranih splenocita prema L929 stanicama dodatno se smanjila, da bi se potpuno uklonila u prisustvu concanamycina, anti-FasL antitijela i anti-TRAIL antitijela. Slično kao u miša i u ljudi IL-15 potiče aktivaciju i citotoksičnost zrelih NK stanica (76,344). Ukratko svi navedeni rezultati ukazuju da je IL-15 i signaliranje putem IL-15 R $\alpha$  podjedinice ključno u razvoju i održavanju osobito stanica koje sačinjavaju prirodenu imunost

(46,76,338,339).

#### 1.4.2.3.3. Izražavanje interleukina-15 i receptora za interleukin-15 na materno-fetalnom spoju

Obje izoforme glasničke RNA za IL-15 (513 bp i 632 bp) i IL-15 protein utvrđeni su u amnionu i korionu (viložnom i ekstraviložnom trofoblastu) metodama *in situ* hibridizacije, analizom cDNA u stanicama izdvojenim na protočnom citometru, te imunocitokemijom (55,346). Ove izoforme glasničke RNA za IL-15 se razlikuju po duljini signalnih peptida koji se iz njih prevode (367). Klasičan signalni peptid od 48 aminokiselina susrećemo u svih oblika IL-15 koji se izlučuje iz stanica, dok IL-15 koji posjeduje kraći signalni peptid od 21 aminokiseline nikad ne izlazi iz stanice i moguće sudjeluje u staničnom signaliranju (348). ELISA esejom dokazan je IL-15 u amnionskoj tekućini i to u višim koncentracijama u žena tijekom prijevremenog poroda u odnosu na žene koje su rađale u predviđenom vremenu, bez obzira da li je infekcija bila uzrok prijevremenom porodu ili ne (346). Nadalje, glasnička RNA za IL-15 i protein, utvrđene su u gotovo svim stanicama iz uzoraka endometrija izvan trudnoće i decidue prvog tromjesečja (55). Kitaja i suradnici (349) i Okada i suradnici (350) ukazuju na ushodnu regulaciju IL-15 tijekom sekrecijske faze endometrijskog ciklusa u odnosu na proliferacijsku fazu na razini glasničke RNA, dok Verma i suradnici (55) govore tek o neznatnim varijacijama tijekom endometrijskog ciklusa. Međutim, svi autori se slažu da se u decidui prvog tromjesečja trudnoće glasnička RNA za IL-15 izražava znatno više u odnosu na endometrij izvan trudnoće (55,249), kao i u odnosu na korionske resice (350). Analiza visoko pročišćene cDNA iz izdvojenih stanica posteljice protočnim citometrom ukazuje na prisutnost glasničke RNA za IL-15 u decidualnim makrofazima i NK stanicama, ali ne i u decidualnim limfocitima T (55). Glasnička RNA i protein za ovaj citokin su utvrđeni u decidualnim stromalnim i epitelnim stanicama (249). ELISA esejom IL-15 je utvrđen u decidualnim stanicama, te pročišćenim populacijama ekstraviložnog trofoblasta, makrofaga i stromalnih stanica (55). Najviša koncentracija IL-15 utvrđena je u supernatantu makrofaga, gdje iznosi 40 pg/ml (55). U mediju s progesteronom i prostaglandinom E decidualni makrofagi luče manje IL-15 (55). Za razliku od makrofaga, decidualne stromalne stanice pod djelovanjem progesterona povećale su početno neznatno lučenje IL-15 (55,249,350). Ovako široka rasprostranjenost



glasničke RNA za IL-15 i proteina, te dokazi o lučenju IL-15 na materno-fetalnom spoju upućuju na važnu ulogu ovog citokina u regulaciji lokalnog imunološkog odgovora. Humane decidualne NK stanice posjeduju receptor za IL-15 (55). Izražavanje visoko specifične IL-15R $\alpha$  podjedinice u kombinaciji sa IL-15R  $\beta$  i  $\gamma$  podjedinicom (jednakim istoimenim podjedinicama receptora za IL-2 ) omogućava im vezanje IL-15 visokim afinitetom (55).

#### 1.4.2.3.4. Uloga interleukina-15 na materno-fetalnom spoju

Interleukin-15 se u decidui glodavaca i ljudi smatra glavnim djelotvornim čimbenikom za preživljavanje i proliferaciju decidualnih NK stanica (39,55). Kako je IL-15 kemotaksijska molekula za NK stanice (325), mogao bi biti odgovoran za njihovo naseljavanje, daljnu proliferaciju i diferencijaciju u decidualnom tkivu. U prilog toj hipotezi govori dominacija NK stanica i manja zastupljenost limfocita T<sub>2</sub> uz nedostatak limfocita B i neutrofila u suspenzijama svježe izoliranih limfocita iz decidua prvog tromjesečja trudnoće čovjeka (351). Najnovija istraživanja su pokazala da humane decidualne NK stanice zaista proliferiraju stimulirane s IL-15 *in vitro*, a učinak je ovisan o koncentraciji (55). Optimalna proliferacija se postiže koncentracijom od 5 ng/ml, a uočava se već nakon četrnaestsatne kulture. Ista proliferacija se postiže sa 100 i.j. IL-2, međutim kako je djelovanje IL-2 u decidui uklonjeno višestrukim mehanizmima, vjerojatno IL-15 predstavlja čimbenik proliferacije za decidualne NK stanice. Suboptimalne koncentracije IL-15, koje ne izazivaju proliferaciju, u prisustvu mitomicinom zakočenih stromalnih stanica povećavaju proliferaciju decidualnih NK stanica (55). Nadalje, IL-15 utječe na izražavanje citolitičkog potencijala i citolitičke aktivnosti decidualnih NK stanica. IL-15 je glavni čimbenik za izražavanje perforina u Th2 citokinskom okolišu (39). IL-4, IL-13 i TGF $\beta$ , inače obilno prisutni u decidui glodavaca i čovjeka (74), nisu mogli u pokusima *in vitro* spriječiti stvaranje glasničke RNA za IL-15 u mišjim makrofagima (352). Suprotno tome, IL-10 koji sprječava lučenje većine monokina, povećava razinu glasničke RNA za IL-15 u mišjim makrofagima nakon stimulacije LPS ili mikobakterijom tuberkuloze (352). Najintenzivnije izražavanje glasničke RNA za IL-15 dokazano je između 6-11 dana mišje trudnoće, a to je ujedno vrijeme najintenzivnije sinteze glasničke RNA za perforin (39). Dakle, tijekom trudnoće u miša, dinamiku sinteze glasničke RNA za IL-15 prati izražavanje glasničke

RNA za perforin, granzim A, granzim B i Fas L (39). Stanice odsječka mišjeg utero-placentnog tkiva inkubirane sa IL-15 kroz 24 sata pokazuju 2-10 puta veći porast glasničke RNA za perforin u odnosu na tkivni odsječak inkubiran samo u mediju (39). Kao odgovor na stimulaciju IL-15 primjetilo se da decidualne stanice mlađe gestacijske dobi stvaraju više glasničke RNA za perforin, što upućuje još jednom na ulogu IL-15 u diferencijaciji nezrelih decidualnih NK stanica (39). Inkubacija decidualnih NK stanica u mediju koji sadržava 5 ng/ml IL-15 tijekom 3 dana povećava njihovu citolitičku aktivnost prema NK osjetljivoj K-562 staničnoj liniji jednako učinkovito, kao 100 i.j./ml IL-2. Interleukin-15 također povećava citolitičku aktivnost decidualnih NK stanica prema koriokarcinomskoj liniji JEG-3, iako u manjoj mjeri nego stimulacija sa IL-2 (55). Međutim, IL-15 ne može povećati citotoksičnost prema ekstraviloznom trofoblastu (55). Štoviše, *in vitro* potpomaže invaziju stanica koriokarcinomske JEG-3 stanične linije (353).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Progesteron se tijekom evolucije pojavio rano i sačuvao svoj izvorni oblik, što upućuje na njegovu važnost tijekom reproduktivnog razdoblja žene (143). Na temelju brojnih istraživanja, *in vitro* i *in vivo*, kako na eksperimentalnim životinjama, tako i na limfocitima periferne krvi trudnica u različitim gestacijskim dobima i s različitim ishodima trudnoća, prepoznala su se imunomodulacijska svojstva progesterona (8,63,147). Progesteron prisutan u plazmi trudnice u većim koncentracijama nego izvan trudnoće, smanjuje stanicama posredovan imunološki odgovor i smanjuje citotoksičnost NK stanica periferne krvi prema embrionalnim fibroblastima (159). Taj učinak progesterona je specifičan i posredovan progesteronom induciranim blokirajućim faktorom (PIBF), kojeg stvaraju progesteron receptor pozitivni limfociti pod djelovanjem progesterona (140,183). Iako su koncentracije progesterona najveće na mjestu njegova stvaranja: materno-fetalnom spoju, do danas se nedovoljno zna o utjecaju i mehanizmu djelovanja progesterona na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita. Cilj ove doktorske disertacije bio je istražiti mogući utjecaj i mehanizam djelovanja progesterona i PIBF na brzu citolitičku aktivnost decidualnih limfocita posredovanu perforinom, kao i prisutnost i raspodjelu PIBF; medijatora progesteronskog djelovanja, u decidui prvog tromjesečja humane trudnoće. Decidualni limfociti predstavljaju većinom NK stanice, koje su zbog proliferacije i razvoja u svom okolišu, *in situ*, osebujne po svom fenotipu i funkciji. Usprkos CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> fenotipu nezrelih NK stanica (13), imunokompetentne su i aktivirane, što dokazuju brojna zrnca ispunjena citolitičkim medijatorom-perforinom (41). *In vitro*, IL-15 je glavni citokin odgovoran za proliferaciju i diferencijaciju decidualnih NK stanica, te za ushodnu regulaciju perforina (55,254). Međutim, decidualne NK stanice ne pokazuju citotoksičnost prema trofoblastu, bez prethodne stimulacije s IL-2 ili IL-12 (318). Vrlo složena citokinska mreža u decidui do danas je tek djelomično istražena, kao i njezin utjecaj na NK staničnu citotoksičnost. Smatra se da progesteron u decidui potiče lučenje citokina Th2 skupine i tako podržava nisku citolitičku aktivnost decidualnih limfocita *in vivo* (4). Međutim, progesteron ne sprječava odgovor decidualnih NK stanica na stimulaciju Th1 citokinima, koji su dokazani u decidui tijekom patoloških trudnoća s prijevremenim gubicima ploda (65,272,277,355). Stoga se drugi dio naših istraživanja odnosio na utjecaj Th1 citokina: IL-2, IL-12, IL-15 i Th2 citokina IL-10 na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita posredovanu perforinom. Istraživali smo, također, međusobni utjecaj progesterona i PIBF s

IL-15 u regulaciji citolitičke aktivnosti i izražavanja perforina u decidualnim limfocitima, prisutnost i raspodjelu IL-15 u humanom decidualnom tkivu, te utjecaj progesterona na izražavanje IL-15 u decidualnim adherentnim stanicama *in vitro*.

### 3. MATERI JAL I METODE

### 3.1. Materijal

#### 3.1.1. *Kemikalije*

Aceton, Kemika

3-amino-9-eathyl-carbasol, Sigma

Cetil-piridinum klorid, Sigma

Concanamicin A, Sigma

Diaminobenzidine (DAB), Sigma

Ethylenediaminetetraacetate- $\text{Na}_2$ -salt (EDTA ), Merck

Fetal calf serum (FCS), Gibco

Gelatin, Sigma

Glycerinum, Alkaloid

Hemalaun, Merck

Hepes, Serva

Ionomycin, Sigma

Kalcij klorid, Kemika

Kalij dihidrogenfosfat, Kemika

Kalij klorid, Kemika

Gentamicyn sulfat, Serva

L-Glutamin, Merck

Limunska kiselina, Kemika

Lymphoprep, Nycomed, Pharma

Magnezij klorid heksahidrat, Kemika

Monenzim, Sigma

Natrij acetat trihidrat, Kemika

Natrij azid, Difco

Natrij dihidrogenfosfat-2-hidrat, Kemika

Natrij hidroksid, Kemika

Natrij klorid, Kemika

Nikal sulfat, Kemika

Natrij wolframat bihidrat, Sigma

N-N dimethylformamide, Merck

Octena kiselina 96%, Kemika

Paraformaldehid, Kemika

Paraplast, Shaldon  
Penicilin, Grunenthal  
Phorbol-myristate-acetat (PMA), Sigma  
Propidium iodid, Sigma  
RPMI 1640, Imunološki zavod, Zagreb  
Saponin, Sigma  
Srebrni nitrat, Kemika  
Streptomycin sulfat, Merck  
Tripansko modriilo, Serva  
Tripsin 0,125, Difco  
Tris base, Sigma  
Triton-X 100, Serva  
Vitamin C, Pliva  
Vodikov peroksid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Kemika

### **3.1.2. Mediji**

#### **1. Medij za kulturu tkiva (10% RPMI)**

RPMI 1640 1 l, L-glutamin 2 mM, HEPES, pH 7,2 10 mM, Penicilin  $1 \times 10^5$  U/l, Streptomycin sulfat 0,1 g/l, Gentamycin sulfat 0,05 g/l, serum govedeg fetusa (FCS) 10%.

#### **2. Puferirana fiziološka otopina (PBS)**

Natrij klorid 140 mM, kalij klorid 2,7 mM, natrij hidrogenfosfat dihidrat 6,5 mM, kalij dihidrogen fosfat 1,5 mM, kalcij klorid 0,7 mM, magnezij klorid heksahidrat 0,7 mM.

#### **3. Puferirana fiziološka otopina za imunohistologiju (PBS za imunohistologiju)**

Natrij hidrogenfosfat dodekahidrat 7,2 g, natrij klorid 16 g, kalij hidrogenfosfat 0,816 g, destilirana voda 2 l.

#### **4. Medij za protočni citometar**

PBS 1 l, EDTA 10 mM, HEPES, pH 7,2, 20 mM, serum govedeg fetusa 2%, natrij azid 0,1%.



### **5. Paraformaldehid 4%, pH 7,4**

PBS 1 l, paraformaldehid 40 g/l, natrijhidrogenfosfat dihidrat 16,83 g/l, natrij hidroksid 3,85 g/l, glukoza 5,4 g/l.

### **6. Otopina saponina**

PBS 1 l, saponin 0,1%, serum goveđeg fetusa 2%, EDTA 1 mM.

### **7. Otopina limunske kiseline pH 6,0**

Destilirana voda 1 l, monohidrat limunske kiseline 2,1 g/l, podesiti na pH 6,0 s NaOH.  
(2 M)

### **8. LSAB-HRPO kemikalije za imunohistologiju, DAKO**

8.1. Otopina za blokiranje: PBS koji sadrŹava nosaĉ bjelanĉevina, natrij azid 15 mM.

8.2. Otopina sekundarnih antitijela: biotinizirana anti-zeĉja i anti-mišja antitijela, PBS koji sadrŹava nosaĉ bjelanĉevina, natrij azid 15 mM.

8.3. Koncentrat streptavidina: streptavidin konjugiran s horseradish peroksidazom u Tris-HCl puferu, natrij azid 15 mM .

8.4. Otopina za razrijeđenje streptavidina: Tris-HCl pufer

### **9. Acetatni pufer za pripremu otopine aminoetilkarbazola (AEC)**

21 ml otopine A + 79 ml otopine B

Otopina A: octena kiselina 96% 5,75 ml, destilirana voda 1 l.

Otopina B: natrij-acetat trihidrat 13,61 g, destilirana voda 1 l.

### **10. Koncentrat aminoetilkarbazola (AEC)**

3-amino-9-etil -karbazol 4 mg, N-N-dimetilformamida 1 ml.

### **11. Radna otopina AEC**

Acetatni pufer 14 ml, koncentrat aminoetilkarbazola 1 ml, 30% vodikov peroksid 15  $\mu$ l.

### **12. Otopina trisma base pH 7,5 (TB)**

Destilirana voda 1 l, trisma base 6 g/l, podesiti na pH 7,5 sa HCl (5M).

### **13. Puferirana otopina trisma base (TBS)**

Otopina trisma base 900 ml, natrij klorida 8,1 g.

### **14. Radna otopina diaminobenzidina (DAB)**

Otopina trisma base, pH 7,5 25 ml, DAB 5 mg, nikal sulfat heksahidrat 14 mg, vodikov peroksid 30% 2 µl.

### **15. Radna otopina srebrnog nitrata za intenzifikaciju specifičnog obilježavanja antigena**

Radna otopina se sastoji od otopine A: otopine B: otopine C pomiješanih u omjeru 8:1:1.

*Otopina A:* 2,3 mg natrij acetata, 20 ml redestilirane vode, 240 µl 96% octene kiseline, 4 ml 1% srebrnog nitrata, 0,4 ml 1% cetil piridinum klorida otopiti i ostaviti na +4°C preko noći. Ujutro filtrirati kroz vatu i dodati 2,4 ml 1% triton x 100, te dodati redestilirane vode do 32 ml;

*Otopina B:* 0,25 g natrij wolframata bihidrata, 5 ml redestilirane vode;

*Otopina C:* 200 mg vitamina C, 100 ml redestilirane vode.

### **16. Glicerol-želatina**

Destilirana voda 40 ml, glicerol 50 ml, gelatin 7 g.

### **17. PKH-26 Red Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma**

Boja: PKH-26 crveno-narančasta fluorescentna lipofilna boja.

Otapalo: Diluent C

#### **3.1.3. Citokini**

Interleukin-2 (IL-2), Sigma

Interleukin -10 (IL-10), Pharmingen

Interleukin-12 (IL-12), Pharmingen

Interleukin-15 (IL-15), R&D Systems

Progesteronom inducirani blokirajući faktor ili PIBF (od eng. Progesterone Induced Blocking Factor) – rekombinantna bjelančevina, dar je prof. dr. sc. Szekeres-Bartho J.

(Zavod za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta u Pečuhu, Pečuh, Mađarska).

### **3.1.4. Hormon**

Progesteron, Sigma

### **3.1.5. Antitijela**

#### **3.1.5.1. Antitijela korištena za imunocitokemijsko obilježavanje**

1. Poliklonska zečja anti-humana anti-PIBF antitijela, Laboratorij Zavoda za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Pečuhu, Mađarska;
2. Zečji serum razrijeđen 1:1000, Laboratorij Zavoda za fiziologiju, patofiziologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta u Rijeci;
3. Monoklonsko mišje anti-humano anti-CD56 antitijelo, mišji ascites, Sigma-Aldrich, Mađarska;
4. Serum Balb/c miša razrijeđen 1:1000, Laboratorij Zavoda za fiziologiju, patofiziologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta u Rijeci;
5. Sekundarna zečja ili kozja anti mišja antitijela konjugirana sa peroksidazom, Dakopatts, Mađarska.

#### **3.1.5.2. Antitijela korištena za imunohistokemijsko obilježavanje**

1. Poliklonska zečja anti-humana anti-PIBF antitijela, Laboratorij Zavoda za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Pečuhu, Mađarska;
2. Zečji serum razrijeđen 1:1000, Laboratorij Zavoda za fiziologiju, patofiziologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta u Rijeci;
3. Monoklonsko mišje anti-humano anti-IL-15 antitijelo, IgG1, R& D Systems;
4. Monoklonsko mišje anti humano IgG1 antitijelo, hibridom: ACT-1, Laboratorij Zavoda za fiziologiju, patofiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci;
5. Sekundarna zečja ili kozja anti mišja antitijela konjugirana sa peroksidazom, Dako;
6. Standardna otopina sekundarnih antitijela: biotinizirana anti-zečja i anti-mišja antitijela, te streptavidin konjugiran s peroksidazom (LSAB-HRP Kit, Dako).

### 3.1.5.3. Antitijela korištena u direktnoj i indirektnoj imunofluorescenciji

1. Monoklonsko mišje anti-humano anti-IL-15 antitijelo, IgG1, R& D Systems;
2. Monoklonsko mišje anti-humano IgG1 antitijelo, hibridom: ACT-1, Laboratorij Zavoda za fiziologiju, patofiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci;
3. Monoklonsko mišje anti-humano anti-HLA-DR antitijelo konjugirano sa PE, IgG2a, Immunotech;
4. Mišji serum razrijeđen 1:1000, Zavod za fiziologiju, patofiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci;
5. Monoklonsko mišje anti-humano anti-perforinsko antitijelo, IgG2b, hibridom  $\delta$ G9, Laboratorij Zavoda za imunologiju i mikrobiologiju Medicinskog fakulteta u Miamiu, Florida, SAD;
6. Monoklonsko mišje anti-humano IgG2b antitijelo, hibridom Ma-125, Laboratorij Zavoda za fiziologiju, patofiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci;
7. Sekundarno monoklonsko kozje anti-mišje antitijelo konjugirano s FITC-om, Becton-Dickinson.

### 3.1.5.4. Blokirajuća antitijela

1. Poliklonska zečja anti-humana anti-PIBF antitijela, Laboratorij Zavoda za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Pečuhu, Mađarska.

### 3.1.6. Laboratorijsko posuđe

Erl-Mayerova tikvica 100 ml, Boral

Kivete (staklene i plastične), Kartell

Neubauerova komorica za brojenje stanica

Pasteurova pipeta, Kartell

Plastična kazeta za imunohistologiju, Kartell

Plastični nastavci za pipete, 0-1000  $\mu$ l, Kartell

Plastična kušalica sa zatvaračem, 50 ml, Falcon

Plastična Petrijeva zdjelica, 100 x 20 mm, (Tissue culture grade quality), Grainer

Plastične kušalice za protočni citometar 12 x 70 mm, Falcon

Plastične ploče za kulturu tkiva s 6 rupica, (Tissue culture grade quality), Grainer

Plastične ploče za kulturu tkiva s 24 rupice (Tissue culture grade quality), Grainer

Predmetno i pokrovno stakalce, Tlos

Staklena čaša (50ml) s plastičnom mrežicom

Staklene pipete, 10 ml, Brand

Škarice i anatomska pinceta

Teflonom presvučeni magneti, Kartell

### **3.1.7. *Biološki materijal***

#### **3.1.7.1. Decidualno tkivo**

Decidualno tkivo je dobiveno na odjelu za Planiranje obitelji, Klinika za ginekologiju i porodništvo Kliničkog bolničkog centra Rijeka od žena koje su svojevremeno prekinule trudnoću u prvom trimestru (6-10 tjedan gestacijske dobi), a imale su urednu reprodukciju anamnezu i bar jedno živorođeno dijete. Istraživanje je dio istraživačkog projekta Ministarstva znanosti i tehnologije Republike Hrvatske pod brojem 062001, kojeg vodi akademik Daniel Rukaviina i odobren je od strane Etičke komisije Medicinskog fakulteta u Rijeci.

#### **3.1.7.2. Stanična linija**

NK osjetljiva K-562 stanična linija humane eritroleukemije, Zavod za fiziologiju, patofiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. *Enzimatska razgradnja decidualnog tkiva***

Decidualno tkivo smo obilno ispirali u RPMI 1640 mediju radi uklanjanja ostataka krvi i dalje obrađivali u sterilnim uvjetima. Tkivo smo škaricama usitnili u komadiće veličine 2x2 mm i inkubirali u 10 ml tripsinskog medija (0,125 trypsin, Difco + EDTA) u Erlemayerovoj tikvici s teflonom presvučenim magnetom na magnetskoj mješalici, na temperaturi 37°C tijekom 30 min. Stanice iz suspenzije pokupili smo pipetom, te dodali FCS (eng. Foetal Calf Serum) u količini od 10% volumena suspenzije, te ostavili u plastičnoj kušalici u komori sa laminarnim protokom zraka do završetka enzimatske razgradnje preostalog, još nerazgrađenog tkiva. Naime, ostatak nerazgrađenog tkiva nakon prvih 30 minuta tripsinizacije podvrgli smo tripsinizaciji još dvaput, te suspenziju stanica sakupljali na gore opisan način. Zatim smo staničnu suspenziju dvaput filtrirali kroz najlonsku mrežicu, istaložili centrifugiranjem 10 min na 350 g, te talog

resuspendirali u 5ml RPMI 1640 medija. Dobivenu suspenziju izoliranih stanica pažljivo smo nasložili na gradijent gustoće (Lymphoprep) i centrifugirali 20 min na 600 g. Prsten naslojenih mononuklearnih stanica koji se stvori na dodirnoj plohi pokupili smo Pasteurovom pipetom, te stanice isprali 2 x u RPMI 1640 mediju, a zatim izbrojili i resuspendirali u koncentraciji  $10^6$  stanica/ml RPMI medija za kulturu tkiva.

### 3.2.2. *Odvajanje decidualnih limfocita od decidualnih adherentnih stanica*

Puna suspenzija decidualnih stanica dobivenih centrifugiranjem na gradijentu gustoće sastoji se od neadherentne frakcije (65%) i decidualnih adherentnih stanica (DACa) (35%), koje se priljube za plastično dno Petrijeve zdjelice za kulturu tkiva već nakon 1–2 sata inkubacije *in vitro* (13). Neadherentna frakcija predstavlja decidualne limfocite (DL), koji se sastoje od decidualnih NK stanica (80-85%) i decidualnih limfocita T (10-15%). Decidualne limfocite smo izdvajali pažljivim pipetiranjem kao neadherentnu frakciju stanica iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica nakon 2, 18 ili 72 sata kulture samo u mediju za kulturu tkiva. Na isti smo način odvajali decidualne limfocite kao neadherentnu frakciju iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih u prisustvu različitih tvari (opisano pod "*Stimulacija pune suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica in vitro*") po isteku inkubacije od 18 ili 72 sata. Tako izdvojenim decidualnim limfocitima određivali smo citolitičku aktivnost protiv K-562 stanične linije, izražavanje perforina, te izražavanje IL-2R $\alpha$  i  $\beta$  lanca.

Decidualne adherentne stanice heterogena su stanična populacija koju sačinjavaju stromalne stanice (80%) i makrofagi koji su zastupljeni od 15-20% (356). Među adherentnim stanicama nalazile su se malobrojne stanice trofoblasta i žljezdanog epitela (356). Decidualne adherentne stanice smo izdvajali iz pune suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica na kraju 18-satnih kultura u mediju samom ili nakon stimulacija s progesteronom ili PIBF. U tu svrhu tretirali smo DAC s 3-5 ml 0,125% tripsina kroz nekoliko minuta na 37°C u vlažnoj atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>, kako bi se odvojile od plastičnog dna. Tripsinizaciju smo zaustavljali s 5 ml 10% RPMI medija čim bi okom, uz pomoć invertnog mikroskopa, vidjeli morfološke promjene na stanicama u vidu nestanka staničnih nastavaka i zaobljavanja stanica. Adherentne stanice bi tada postale slobodno pomične u mediju i lako bi se pokupile pipetom u plastičnu kušalicu. Centrifugiranjem 350 g/10 min istaložili smo stanice, na talog dodali 1 ml 10% RPMI medija, a broj i vijabilnost stanica određivali tripanskim modrilom.

Vijabilnost je uvijek bila viša od 98%. DAC smo koristili za stimulaciju DL direktnim kontaktom, za pripremu supernatanta, te za određivanje ispoljenosti interleukina-15.

### **3.2.3. Stimulacija pune suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica *in vitro***

Punu suspenziju decidualnih stanica dobivenih centrifugiranjem na gradijentu gustoće kultivirali smo preko noći (18 sati):

- samo u mediju za kulturu tkiva ili u prisustvu slijedećih tvari:
- progesterona (5 ili 10 µg/ml);
- PIBF (1, 2 ili 5 µg/ml);
- progesterona (10 µg/ml) i anti-PIBF antitijela (20 µg/ml);
- progesterona (10 µg/ml) i IL-15 (5 ng/ml);
- PIBF (2 µg/ml) i IL-15 (5 ng/ml);
- IL-2 (100 ili 1000 i.j./ml)
- IL-10 (1 ng/ml)
- IL-12 (50 pg/ml)
- IL-15 (5 ng/ml);

Istu suspenziju decidualnih stanica stimulirali smo s IL-15 (2 ili 5 ng/ml) tijekom 72 sata.

### **3.2.4. Stimulacija decidualnih limfocita**

Svježe izolirane decidualne limfocite izdvojene iz pune suspenzije mononuklearnih stanica nakon dva sata adherencije *in vitro* stimulirali smo preko noći (slijedećih 16 sati):

- samo u mediju za kulturu tkiva;
- u prisustvu 30% DAC;
- u supernatantu DAC.

### **3.2.5. Priprema supernatanta decidualnih adherentnih stanica**

Decidualne stanice ( $10^6$ /ml), izdvojene iz pune suspenzije decidualnih stanica nakon 18-satne kulture *in vitro*, inkubirali smo u mediju za kulturu tkiva slijedećih 24 sata. Na kraju kultivacije supernatant smo pokupili pipetom i centrifugirali radi taloženja slučajno pokupljenih stanica. Nakon centrifugiranja supernatant je lagano pokupljen plastičnom pipetom i odmah upotrebljen ili pohranjen na  $-20^{\circ}\text{C}$  do upotrebe.

### 3.2.6. Test citotoksičnosti

Za ispitivanje citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita kao izvršnih stanica protiv NK osjetljive K-562 stanične linije koristili smo PKH-26 red fluorescent linker kit (Sigma) uz analizu protočnim citometrom. Ovaj kit sadrži crvenu PKH-26 lipofilnu boju koja se nespecifično veže za lipidne komponente stanične membrane. U našim pokusima smo ciljne K-562 stanice obilježene PKH-26 bojom pomiješali s neobilježenim decidualnim limfocitima u različitim omjerima 6:1, 12:1, 25:1 i 50:1. PKH-26 bojom obilježene ciljne stanice fluoresciraju crveno i na protočnom citometru se prikazuju kao FL2 pozitivne. Na taj smo način protočnim citometrom mogli razlikovati ciljne stanice koje su fluorescirale crveno u FL2 fluorescenciji, od neobilježenih (FL2 negativnih) izvršnih stanica. Broj mrtvih stanica određivali smo propidium iodidom, kojeg smo u koncentraciji od 10 mg/ml dodavali u volumenu od 200 ml u suspenziju ciljnih i izvršnih stanica neposredno pred očitavanje na protočnom citometru. Mrtve stanice ne mogu izbaciti propidium iodid, koji se stoga nagomilava u citoplazmi stanica i boji ih narančasto-crveno, što se na citometru prikazuje kao FL3 fluorescencija. Postotak ubijenih ciljnih K-562 stanica unutar ograde, koja obuhvaća sve ciljne K-562 stanice predstavljao je stupanj citolitičke aktivnosti izvršnih stanica-decidualnih limfocita u pojedinim omjerima izvršnih/ciljnih stanica. Od tog postotka ubijenih K-562 stanica u svakom pojedinom omjeru oduzimao se postotak spontano mrtvih K-562 stanica, isto kao i postotak spontano mrtvih decidualnih limfocita. Naime, propidium iodid dodan u suspenziju izvršnih i ciljnih stanica, bez razlike boji sve mrtve stanice, tako da se dio mrtvih decidualnih limfocita obojenih propidium iodidom prikazivao u točkastom grafu na istom mjestu, kao i mrtve K-562 stanice.

#### 3.2.6.1. Priprema ciljnih stanica za test citotoksičnosti

NK osjetljive K-562 ciljne stanice humane eritroleukemijske stanične linije uzgajane su *in vitro* u vlažnoj atmosferi, na temperaturi 37°C s 5% CO<sub>2</sub> u plastičnim flaskovima za kulturu tkiva (Grainer). Dohranjivane su svaki drugi dan medijem za kulturu tkiva. Prije uzimanja stanica iz kulture, flask smo držali na ledu 45 min radi odvajanja stanica od plastičnog dna. Pokupljene stanice ispirali smo od FCS-a prisutnog u mediju za kulturu tkiva centrifugiranjem 3 x na 350 g/5min u RPMI 1640 mediju. Po ispiranju stanice smo izbrojili u tripanskom modrilu i odredili njihovu vijabilnost, koja je uvijek iznosila više od 95%. Zatim smo iz suspenzije izdvojili  $2,5 \times 10^6$  K-562 stanica i istaložili ih centrifugiranjem 350 g/5min. Supernatant smo u što većoj mjeri pokupili pipetom, a na



talog dodali 260 ml Diluenta C iz PKH-26 red cell linker kita (Sigma). U drugoj kušalici razrijedili smo 1,5 ml PKH-26 boje sa istom količinom Diluenta C i dodali resuspendirane stanice u razrijeđenu boju. Stanice smo bojili 3-5 minuta uz povremeno miješanje pipetom, a bojenje zaustavili dodavanjem 500  $\mu$ l FCS, koji je vezao višak boje na sebe i inkubirali 1 minutu. Višak boje smo uklanjali ispiranjem stanica 4 x u 10% RPMI mediju (350 g/5min), izbrojali i podesili  $1 \times 10^5$ /ml 10% RPMI medija. Tako podešene stanice ostavili smo na ledu 45-60 minuta radi boljeg fiksiranja boje na membranama stanica.

### 3.2.6.2. Priprema izvršnih stanica za test citotoksičnosti

Izvršne stanice u testu citotoksičnosti su bile decidualne mononuklearne stanice svježe izdvojene na gradijentu gustoće ili decidualne mononuklearne stanice kultivirane nakon izdvajanja na gradijentu gustoće tijekom 18 sati *in vitro*. Nadalje, izvršne stanice u testu citotoksičnosti bili su decidualni limfociti dobiveni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kao neadherentna frakcija i to nakon 2, 18 ili 72 sata kultiviranja *in vitro* u mediju samom ili u prisustvu odgovarajućih stimulacijskih tvari. Priprema decidualnih limfocita počinje njihovim ispiranjem u RPMI 1640 mediju (350 g/10 min) i brojenjem uz određivanje vijabilnosti tripanskim modrilom. Pokus smo nastavljali samo s visoko vijabilnim stanicama, kojih je vijabilnost u ovoj fazi bila viša od 85-90%. Visoko vijabilne stanice izbrojili smo i podesili na koncentraciju  $5 \times 10^6$ /ml 10% RPMI medija, te ostavljali na ledu do postavljanja u odgovarajuće odnose s ciljnim stanicama. Decidualne limfocite kultivirane samo u mediju tijekom 18 sati ili u prisustvu IL-15 (5ng/ml), tijekom 72 sata, podijelili smo u dvije kušalice, u svaku oko  $2 \times 10^6$  stanica. Jedne smo inkubirali u prisustvu blokatora vezikularnog transporta Concanamicina A (100 nM), a druge samo u mediju tijekom 2 sata u vlažnoj sredini na 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Po isteku inkubacije stanice smo centrifugirali (350 g/10 min), odlili supernatant, i na talog dodali svježi 10% RPMI medij za kulturu tkiva. Decidualne limfocite smo tada izbrojili i podesili na  $5 \times 10^6$ /ml 10% RPMI medija. Do postavljanja u odgovarajuće odnose s ciljnim stanicama decidualne limfocite držali smo na ledu.

### 3.2.6.3. Postavljanje izvršnih i ciljnih stanica u odgovarajuće odnose

Izvršne stanice, decidualne limfocite (DL), i ciljne K-562 stanice postavljali smo u odgovarajuće odnose u Falcon plastične kušalice na slijedeći način:

Br. kušalice	DL (5x10 <sup>6</sup> /ml)	K-562 stanice (1x10 <sup>5</sup> /ml)	10% RPMI
1. DL	100 $\mu$ l	----	100 $\mu$ l
2. K-562	----	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
3. 50:1	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	----
4. 25:1	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
5. 12:1	25 $\mu$ l	100 $\mu$ l	75 $\mu$ l
6. 6:1	12 $\mu$ l	100 $\mu$ l	88 $\mu$ l

Po postavljanju, stanice smo centrifugirali 140 g/5min kako bi izvršne i ciljne stanice došle u bolji kontakt, a zatim smo ih inkubirali u vlažnoj sredini na 37°C i 5% CO<sub>2</sub> tijekom 2 sata. Po isteku dvosatne inkubacije stanice smo isprali od 10% RPMI medija za kulturu tkiva centrifugiranjem na 350 g/5min i resuspendirali u 300  $\mu$ l medija za protočni citometar. Neposredno pred očitavanje na protočnom citometru dodali smo 200  $\mu$ l propidium iodida u koncentraciji 10  $\mu$ g/ml i očitavali na protočnom citometru.

### 3.2.7. Metoda imunofluorescencije uz očitavanje protočnim citometrom

#### 3.2.7.1. Obilježavanje unutarstaničnog biljega - perforina metodom indirektno imunofluorescencije

U našim pokusima analizirali smo izražavanje perforin-bjelančevine u suspenzijama decidualnih limfocita neposredno prije ulaska stanica u test citotoksičnosti i nakon dvosatnog izlaganja K-562 ciljnim stanicama u omjeru 50:1. Podesili smo koncentraciju stanica na 10<sup>6</sup> po uzorku i isprali u mediju za protočni citometar (350 g/5min). Supernatant smo odlili, a stanice fiksirali sa 100  $\mu$ l 4% paraformaldehida tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Paraformaldehid smo isprali centrifugiranjem 2 x na 350 g/5min u mediju za protočni citometar, te stanice resuspendirali u 100  $\mu$ l otopine saponina. Kratkotrajna inkubacija stanica u saponinu (20 min) služi za permeabilizaciju staničnih membrana, kako bi anti-perforinska antitijela mogla ući u stanicu i vezati se za perforin pohranjen u citoplazmatskim zrnima stanica citotoksična fenotipa. Monoklonska mišja anti-humana anti-perforinska antitijela, IgG2b izotipa, dodali smo u količini 3  $\mu$ g po uzorku decidualnih stanica, razrijeđena u 100  $\mu$ l otopine saponina. Supernatant koji sadrži monoklonska IgG2b antitijela razrijeđen u omjeru 1:5 u otopini saponina služio je kao kontrola. Stanice su sa primarnim antitijelima inkubirane 30 min

na +4°C, a zatim 2 x isprane u saponinu (350 g/5min). Sekundarno kozje anti-mišje antitijelo direktno obilježeno FITC-om (fluorescein-izo-tio-cijanatom) dodali smo na talog stanica u količini 1 µg po uzorku. Stanice su ponovo inkubirane 30 min na +4°C, a zatim isprane 2 x u otopini saponina. Na talog smo dodali 500 µl medija za protočni citometar radi zatvaranja permeabilizirane stanične membrane. Obilježene uzorke stanica pohranjivali smo na +4°C do očitavanja na citometru.

### 3.2.7.2. Dvostruko obilježavanje unutarstaničnog biljega - interleukina-15 ndirektnom imunofluorescencijom i površinskog HLA-DR biljega direktnom imunofluorescencijom

Decidualne adherentne stanice izdvojili smo iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih preko noći samo u mediju za kulturu tkiva, u prisustvu progesterona (10 µg/ml) ili PIBFa (5 µg/ml). Stimulirali smo ih sa phorbol-myristat acetatom (PMA) (10 ng/ml) i ionomicinom (1 µM/ml) tijekom 4 sata u vlažnoj sredini na 37°C i 5% CO<sub>2</sub>, radi poticanja stvaranja IL-15 u stanicama. Zadnja 2 sata stimuliranu suspenziju kultivirali smo s monenzimom u koncentraciji 1 mM). Nakon toga postupak obilježavanja interleukina-15, kao unutarstaničnog biljega identičan je postupku obilježavanja perforina, koji je prethodno opisan. Monoklonska mišja anti-interleukin-15 protutijela IgG1 izotipa dodavana su u količini od 3 µg po uzorku razrijeđenena u 100 µl otopine saponina. Za kontrolu specifičnog obilježavanja koristili smo supernatant koji sadrži monoklonska mišja antitijela IgG1 izotipa razrijeđena 1:2. Nakon obilježavanja IL-15 i po zatvaranju stanične membrane u mediju za protočni citometar, stanice smo obilježavali anti-HLA-DR antitijelima. Anti-HLA-DR antitijela direktno konjugirana sa phycoerytrinom (PE) u količini od 20 ml po uzorku dodavali smo na talog stanica i inkubirali 30 min na +4°C. Nakon inkubacije, stanice su isprane 2x centrifugiranjem na 350 g/5min u mediju za protočni citometar, a zatim resuspendirane u 500 µl istog medija. Tako smo uzorke pripremili za očitavanje.

### 3.2.8. Dvostruko obilježavanje svježe izdvojenih decidualnih limfocita metodom imunocitokemije

Svježe izolirane decidualne limfocite smo centrifugirali dvaput u puferiranoj fiziološkoj otopini 350 g/10 min, izbrojili i podesili u koncentraciji  $8 \times 10^5$  stanica/ml puferirane fiziološke otopine. Stanice u navedenoj koncentraciji nanijete su na predmetno staklo u

količini od 100  $\mu$ l centrifugiranjem u citospin centrifugi na 500 okretaja/5 min. Citopreparati su osušeni na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata i uronjeni u kivetu ispunjenu čistim, hladnim acetonom (10 min) radi fiksacije. Fiksirani preparati su preko noći pohranjeni na +4°C. Ujutro smo citopreparate rehidrirali inkubiranjem u kiveti ispunjenoj sa TBS puferom (1x5 min), a endogena peroksidaza je blokirana inkubiranjem u kiveti ispunjenoj s 1% otopinom vodikova peroksida u TBS puferu. Zatim smo preparate isprali 2x2 min u redestiliranoj vodi, te 2x5 min u TBS puferu. Nespecifično bojenje smo blokirali 1% otopinom goveđeg serumskog albumina u TBS puferu kojeg smo nanijeli na preparate u količini od 100  $\mu$ l i inkubirali 20 min u tamnoj i vlažnoj komori na sobnoj temperaturi. Sve slijedeće inkubacije vršili smo pod istim uvjetima. Nakon ispiranja u TBS puferu (2x5 min) citopreparate smo inkubirali 60 min s primarnim antitijelima: zečja anti-humana anti-PIBF poliklonska antitijela u koncentraciji 2  $\mu$ g/ml, 1:100 1% otopine goveđeg serumskog albumina u TBS puferu ili zečji serum razrijeđen 1:1000 u istom mediju. Po isteku inkubacije preparati su isprani 2x5 min u TBS puferu i inkubirani 30 min sa sekundarnim kozjim anti-zečjim antitijelima konjugiranim s peroksidazom (Dako). Preparati su isprani 2x5 min u TBS puferu, a reakcija specifičnog vezanja je vizualizirana aminoetilkarbazolom (AEC). Radnu otopinu AEC-a smo uvijek svježe pripremali neposredno pred korištenje na slijedeći način: u 14 ml acetatnog pufera dodali smo 1 ml koncentriranog AEC i 15  $\mu$ l 30% vodikovog peroksida uz miješanje na magnetskoj miješalici. Otopinu smo profiltrirali kroz filter papir i prekrivali citopreparate s količinom od 100-200  $\mu$ l, te inkubirali 4 minute. Pozitivna obilježavanja očitovala su se razvojem crvene boje. Reakciju smo zaustavljali ispiranjem u redestiliranoj vodi. Obilježavanje površinskog biljega započeli smo uranjanjem preparata u TBS pufer, a daljnji postupak je bio isti kao obilježavanje PIBF-a smještenog u citoplazmi. Koristili smo primarna mišja anti-humana anti-CD56 antitijela (mišji ascites, IgG Sigma-Aldrich) u koncentraciji 8  $\mu$ g/100  $\mu$ l 1% goveđeg serumskog albumina u TBS puferu i sekundarna kozja anti-mišja antitijela konjugirana s peroksidazom (Dako). Reakciju smo razvili diaminobenzidinom (DAB) uz intenzifikaciju srebrom. Radnu otopinu DAB-a smo svježe pripremali na način da smo otopili 5 mg DAB-a, 14 mg nikal sulfat heksahidrata u 25 ml TB pH 7,5 i dodali 2  $\mu$ l 30% vodikova peroksida. Reakciju enzimatskog razgrađivanja substrata zaustavili smo nakon 10-20 min uranjanjem preparata u redestiliranu vodu. Zatim smo preparate uronili u kivetu sa 1% natrij-acetatom i inkubirali 1 min., te smo preparate

uronili u kivetu ispunjenu sa radnom otopinom srebrnog nitrata radi intenzifikacije specifičnog vezanja. Radna otopina srebrnog nitrata sastojala se od otopina A, B i C čiji je sastav naveden pod naslovom "Mediji", pomiješanih u omjeru 8:1:1. Nakon 1 min reakciju intenzifikacije srebrom smo zaustavili uranjanjem preparata u svježi 1% natrij acetat i inkubirali 1 minutu, a zatim dodatno isprali u redestiliranoj vodi. Stanične jezgre obojili smo hematoksilinom tijekom 2-3 minute, isprali u redestiliranoj vodi s 2% octene kiseline (2x3 min), te mlakoj tekućoj vodi (15 min). Na kraju smo preparate pokrili glicerol-želatinom i pokrovnim staklom.

### **3.2.9. Imunohistologija decidualnog tkiva**

#### **3.2.9.1. Imunohistologija decidualnog tkiva uklopljenog u parafin**

##### **3.2.9.1.1. Uklapanje decidualnog tkiva u parafin**

Svježe decidualno tkivo smješteno u plastične kazete držali smo preko noći (18 sati) u otopini 4% paraformaldehida radi fiksacije antigena. Ujutro smo ispirali kazetu sa decidualnim tkivom pod mlazom tekuće vode tijekom 3 sata, te uronili u 20% otopinu etilnog alkohola. Uranjanjem u etilni alkohol započeli smo postupak uklanjanja vode iz tkiva, koji smo nastavili višekratnim naknadnim uranjanjem tkiva po 60 min u etilni alkohol sve veće koncentracije (50-90%). Na kraju smo tkivo držali 3 sata u 100% etilnom alkoholu. Daljnjim ispiranjem u 100% xylolu (3x60 min) uklanjali smo alkohol iz tkiva, kako bismo tkivo što bolje uklopili u derivat parafina. Naime, Paralast (Shaldon) je parafin s plastičnim polimerom, koji nije topljiv u vodi i alkoholu, nego samo u xylolu. Paraplast smo otopili na 57-60°C u parafinskoj peći u tri staklene posude, a zatim smo tkivo u kazetama iz xylola uronili u Paraplast (3x60 min). Na kraju smo kazetu otvorili i otvorenu položili u metalni kalup s Paraplastom, te dobro ohladili na sobnoj temperaturi do slijedećeg dana. Odvajanjem metalnog kalupa od parafinskog bloka s tkivom pripremili smo uzorke za rezanje na mikrotomu. Rezove debljine 2 µm, stavljali smo u mlaku vodu kako bi se izravnali nabori tkiva nastali rezanjem. Nakon 10-30 min pokupili smo rezove iz vode silaniziranim staklom i sušili preko noći u uspravnom položaju na 37°C u suhom inkubatoru.

##### **3.2.9.1.2. Uklanjanje parafina iz rezova decidualnog tkiva**

Neposredno prije obilježavanja iz tkivnih rezova smo uklonili parafin uranjanjem preparata u kivetu sa xylolom 3x8 min. Zatim smo isprali xylol uranjanjem preparata u

sve razrijeđenije otopine etilnog alkohola, tako da smo ispirali 2x4 min u 100% alkoholu, 1x4 min u 90% alkoholu, 1x4 min u 70% alkoholu, 1x4 min u 50% alkoholu. Stakalca s preparatima smo potom uronili u destiliranu vodu.

#### *3.2.9.1.3. Postupak otkrivanja antigena uz pomoć mikrovalne pećnice*

Stanične bjelančevine (biljezi) se denaturiraju tijekom izlaganja toplini od 57-60°C tijekom postupka uklapanja u parafin. Kako bi biljezi ponovno poprimili konformaciju koju su posjedovali prije uklapanja, preparate decidualnog tkiva smo tretirali prema uputama tvrtke Dako za ponovno uspostavljanje konformacije bjelančevina. Tako smo preparate uronili u plastičnu kivetu ispunjenu s 0,01 M otopinom limunske kiseline, pH 6,0 i grijali u mikrovalnoj pećnici do vrenja 2x5 min. Između dva grijanja isparenu vodu nadoknadili smo destiliranom vodom. Na kraju smo preparate ohladili na sobnoj temperaturi (30 min), a zatim uronili u PBS za imunohistologiju radi rehidracije.

#### *3.2.9.1.4. Obilježavanje antigena*

Antigene smo obilježavali LSAB-HRP kitom (Dako). Nespecifično smo vezanje blokirali inkubiranjem preparata (5 min) s blokirajućom otopinom iz navedenog kita u tamnoj i vlažnoj komori na sobnoj temperaturi. Sve daljnje inkubacije vršile su se pod istim uvjetima. Primarna protutijela smo razrijeđivali tvorničkom otopinom za razrijeđivanje (Dako) kako slijedi: zečja anti-humana anti-PIBF antitijela koncentracije 2µg/ml, 1:200; mišja anti-humana anti-IL-15 antitijela koncentracije 1 µg/ml, 1:50; zečji serum u razrijeđenju 1:1000 i IgG1 supernatant nerazrijeđen. Preparate smo inkubirali s primarnim protutijelima 30 min, a zatim isprali u PBS otopini za imunohistologiju 3x3 min. Nadalje smo preparate inkubirali sa sekundarnim anti-mišjim i anti-zečjim antitijelima obilježenim biotinom (LSAB-HRP Kit) tijekom 10 min. Ponovno smo preparate isprali 3x3 min. i inkubirali 10 min s razrijeđenom otopinom streptavidina konjugiranog s peroksidazom (LSAB-HRP Kit). Otopinu streptavidina smo pripremali neposredno pred korištenje, tako da smo 25 µl koncentrata streptavidina dodali u 2 ml otopine za razrijeđivanje streptavidina (obje iz LSAB-HRP kita). Nakon ispiranja 3x3 min u PBS mediju za imunohistologiju, reakciju specifičnog vezanja smo razvili u DAB-u. Preparate smo isprali u destiliranoj vodi, a jezgre smo obojili hematoksilinom (2 min). Zatim smo preparate isprali u destiliranoj vodi sa 2% octene

kiseline 2x5 min, te u mlakoj tekućoj vodi 15 min. Na kraju smo preparate osušili pritiskom na staničevinu, prekrili glicerol-želatinom i pokrovnim staklom.

### 3.2.9.2. Imunohistologija smrznutih rezova

Svježe izolirano decidualno tkivo je još na Klinici za ginekologiju i porodništvo naglo smrznuto uranjanjem u tekući dušik ( $180^{\circ}\text{C}$ ) radi što boljeg očuvanja strukture tkiva. Do rezanja tkivo je pohranjeno na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Tkivo je rezano na rezove debljine  $7\ \mu\text{m}$  i postavljano na predmetna stakla obložena silanom. Preparati su osušeni na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata i pohranjeni do obilježavanja na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pred obilježavanje tkivne smo rezove pokrivene aluminijskom folijom ugrijali na sobnu temperaturu, a zatim ih fiksirali u hladnom 100% acetonu tijekom 3-5 min. Po fiksaciji tkivne rezove smo rehidrirali uranjanjem (10 min) u PBS mediju za imunohistologiju. U daljnjem postupku obilježavanja antigena interleukina-15 koristili smo LSAB-HRP Kit i slijedili isti postupak kao kod obilježavanja tkiva uklopljenih u parafin. Kao primarna antitijela koristili smo mišja anti-humana anti-IL-15 antitijela koncentracije 1 mg/ml u razrijeđenju 1:50, te IgG1 supernatant nerazrijeđen. Jedino smo reakciju specifičnog vezanja razvijali aminoetilkarbazolom umjesto DAB.

### 3.3. Statistička analiza

Razlike između pojedinih grupa izračunavane su neparametrijskim testom za male i nezavisne uzorke (Mann-Whitney U-test). Statistički značajnu razliku između dviju grupa utvrdili smo na razini značajnosti od  $p < 0,05$ . Statistika je rađena uz pomoć kompjutorskog programa Statistica for Windows, Kernel release 5.5A (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Rezultati su prikazani uz pomoć kompjutorskog programa Sigma Plot for Windows, version 1.02 (Jandel Scientific Software, Chikago, IL, USA).

## 4. REZULTATI



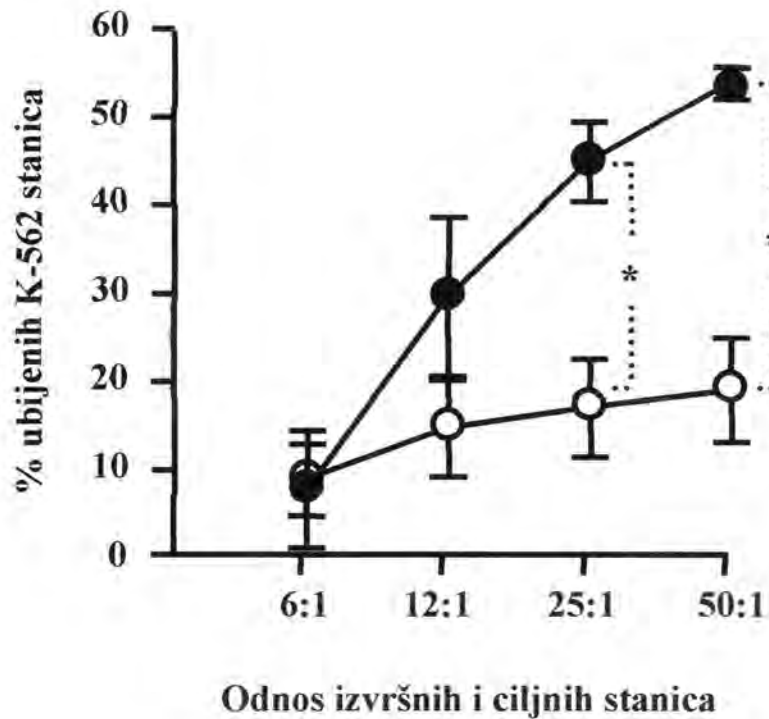
#### 4.1. Učinak procesa izdvajanja decidualnih adherentnih stanica i njihovih topljivih čimbenika na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita *in vitro*

Suspenziju mononuklearnih stanica dobili smo enzimatskom razgradnjom decidualnog tkiva i naslojavanjem dobivene suspenzije stanica na gradijent gustoće, kako je prethodno opisano. Upotrebljavali smo proteolitički enzim-tripsin koji tijekom izdvajanja stanica iz tkiva može denaturirati ili potpuno pocijepati proteine s površine imunosnih stanica, koji sudjeluju u prenošenju informacije za citolitičku aktivnost u stanicu. Stoga smo istraživali citolitičku aktivnost decidualnih mononuklearnih stanica neposredno nakon izdvajanja iz tkiva i nakon 18 satne kulture *in vitro* u mediju za kulturu tkiva. Izvršne stanice smo testirali protiv NK osjetljive K-562 stanične linije humane eritroleukemije u dvosatnom testu citotoksičnosti. Odlučili smo se za ovaj test citotoksičnosti, jer za razliku od klasičnog testa citotoksičnosti u kojem se upotrebljava  $Cr^{51}$  ne stvara radioaktivni otpad i ne izlaže osoblje zračenju, a daje jednako dobre i reproducibilne rezultate. Slika 4.1 prikazuje usporedbu citolitičke aktivnosti decidualnih mononuklearnih stanica svježe izoliranih iz tkiva (n=4) i citolitičke aktivnosti decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati *in vitro* u mediju za kulturu tkiva (n=6). Na x osi koordinatnog sustava nanese su omjeri izvršnih i ciljnih stanica (6:1, 12:1, 25:1, 50:1), a na ordinati postotak ubijenih ciljnih K-562 stanica (NK osjetljiva linija). Svježe izolirane decidualne mononuklearne stanice pokazuju nisku spontanu citolitičku aktivnost prema K-562 stanicama, koja iznosi oko 5% u omjeru izvršnih i ciljnih stanica 6:1, a oko 15% u omjeru izvršnih i ciljnih stanica 50:1 (Slika 4.1). Statistički značajno veću citolitičku aktivnost pokazuju decidualne mononuklearne stanice kultivirane tijekom 18 sati *in vitro* u mediju za kulturu tkiva ( $p < 0,05$  u omjeru 50:1 i 25:1) (Slika 4.1).

Naša ranija istraživanja su pokazala da se decidualne mononuklearne stanice sastoje od različitih staničnih populacija, koje se mogu podijeliti u neadherentnu i adherentnu frakciju na temelju njihovog fizičkog svojstva prijanjanja na staklo ili plastiku (13). Neadherentnu frakciju sačinjavaju decidualni limfociti i to uglavnom: decidualni veliki granulirani limfociti ili LGL (od eng. Large Granular Lymphocytes), a samo manjim dijelom limfociti T (13). Slika 4.2 prikazuje citolitičku aktivnost decidualnih limfocita (neadherentna frakcija) protiv K-562 stanične linije i to: po izdvajanju od decidualnih adherentnih stanica nakon dvosatne adherencije (n=4), nakon izdvajanja dvosatnom adherencijom i dodatnom 16-satnom kultivacijom *in vitro* u mediju za kulturu tkiva

(n=4) ili nakon izdvajanja dvosatnom adherencijom i dodatnom 16-satnom kultivacijom u supernatantu decidualnih adherentnih stanica (n=4). Citolitička aktivnost decidualnih limfocita nakon 18 satne kulture *in vitro* u mediju za kulturu tkiva statistički je značajno niža ( $p < 0,05$  za omjer izvršnih i ciljnih stanica 50:1, 25:1 i 12:1) u odnosu na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita odmah po izdvajanju od decidualnih adherentnih stanica nakon dvosatne adherencije. Supernatant decidualnih stanica dodatno je snižavao citolitičku aktivnost decidualnih limfocita tijekom 16-satne kulture *in vitro* i razlika je bila visoko značajna za sve omjere izvršnih i ciljnih stanica u odnosu na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita izdvojenih od decidualnih adherentnih stanica nakon dvosatne adherencije ( $p < 0,05$ ) (Slika 4.2). Nadalje smo istraživali da li postoji razlika u citolitičkoj aktivnosti decidualnih limfocita, koji su izdvojeni od decidualnih adherentnih stanica nakon 2 sata adherencije i kultivirani daljnih 16 sati *in vitro* u mediju za kulturu tkiva (n=4) i decidualnih limfocita koji su kultivirani kao dio suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica tijekom 18 sati i onda odvojeni od decidualnih adherentnih stanica (n=23) (Slika 4.3). Citolitička aktivnost decidualnih limfocita odvojenih od decidualnih stanica (2 sata adherencije) i kultiviranih 16 sati u mediju statistički je značajno niža u odnosu na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita izdvojenih iz suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica nakon 18 sati kulture ( $p < 0,05$  za omjere izvršnih i ciljnih stanica 50:1 i 25:1) (Slika 4.3).

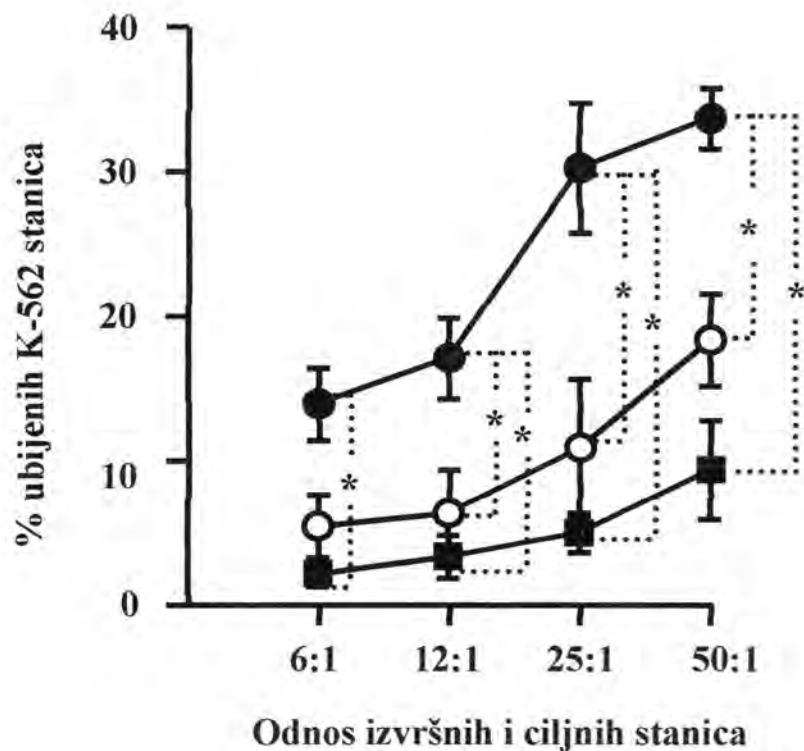
**Slika 4.1. Porast citolitičke aktivnosti pune suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica nakon osamnaestsatne kulture u mediju *in vitro***



\*p < 0,05

- decidualne mononuklearne stanice svježe izdvojene centrifugiranjem na gradijentu gustoće
- decidualne mononuklearne stanice izdvojene centrifugiranjem na gradijentu gustoće i kultivirane 18 sati u mediju *in vitro*

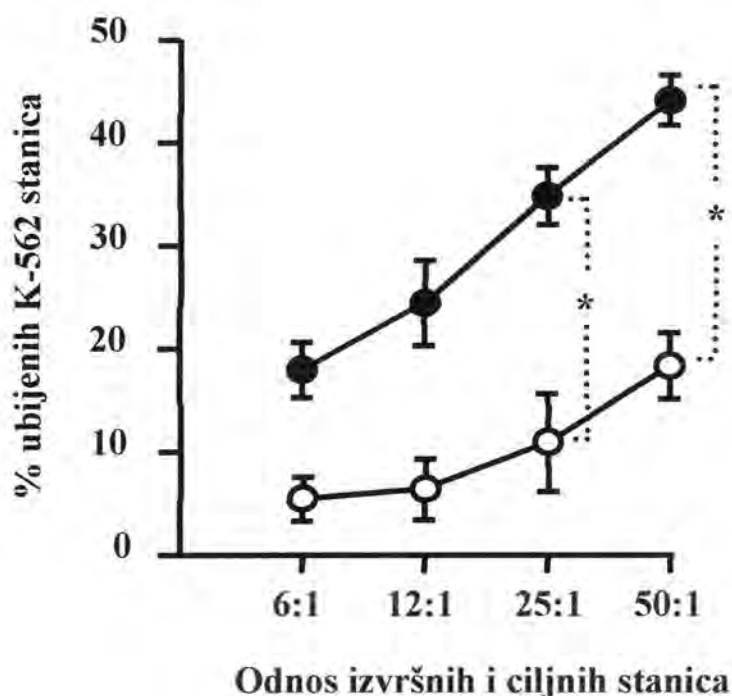
*Slika 4.2. Decidualni limfociti (DL) izdvojeni nakon 2 sata adherencije imaju značajno veću citolitičku aktivnost prema K-562 ciljnim stanicama, nego DL dodatno kultivirani 16 sati u mediju ili u supernatantu decidualnih adherentnih stanica (DAC)*



\*p < 0,05

- DL izdvojeni nakon 2 sata adherencije
- DL izdvojeni nakon 2 sata adherencije i daljnjih 16 sati kultivirani u mediju
- DL izdvojeni nakon 2 sata adherencije i daljnjih 16 sati kultivirani u supernatantu DAC

**Slika 4.3. Decidualni limfociti (DL) izdvojeni iz suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica nakon 2 sata adherencije i kultivirani daljnjih 16 sati u mediju manje ubijaju K-562 staničnu liniju nego DL izdvojeni iz suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica nakon 18 sati kulture u mediju *in vitro***



\*p < 0,05

- DL izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica nakon 2 sata adherencije i kultivirani daljnjih 16 sati u mediju
- DL izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica nakon 18 sati kulture u mediju

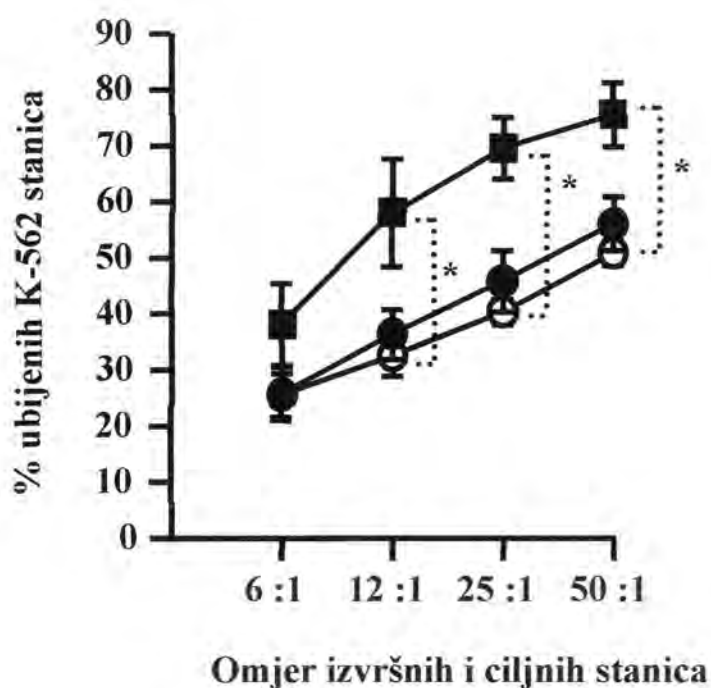
## 4.2. Utjecaj interleukina-2, interleukina-10 i interleukina-12 na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita

Tijekom izdvajanja decidualnih limfocita iz decidue ne uklanja se samo izravni dodir između decidualnih limfocita i drugih stanica, nego i učinci mnogobrojnih topljivih čimbenika-citokina. Stoga smo *in vitro* istraživali učinke slijedećih citokina na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita: IL-10 za kojeg znamo da se i normalno luči u decidui tijekom normalne trudnoće, te IL-2 i IL-12 koji se mogu lučiti u patološkim trudnoćama i tijekom infekcija u trudnoći.

Decidualni limfociti izdvojeni iz suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica nakon 18 sati kulture u mediju s IL-2 pokazuju povećanu citolitičku aktivnost prema K-562 stanicama na način ovisan o koncentraciji IL-2 (Slika 4.4). Naime, decidualni limfociti stimulirani sa IL-2 u koncentraciji 100 i.j./ml (n=8) pokazuju neznatno povećanje citolitičke aktivnosti, ali koncentracija od 1000 i.j./ml (n=8) statistički značajno povećava citolitičku aktivnost decidualnih limfocita ( $p < 0,05$  u omjeru izvršnih i ciljnih stanica 50:1, 25:1 i 12:1) u odnosu na decidualne limfocite kultivirane samo u mediju tijekom 18 sati (n=23). Decidualni limfociti stimulirani s 1000 i.j./ml IL-2 tijekom 18 sati ubijaju čak preko 70% ciljnih NK osjetljivih K-562 stanica u omjeru 50:1 (Slika 4.4).

IL-12 pokazuje slične učinke kao IL-2 (Slika 5). Naime, decidualni limfociti izdvojeni iz suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih u mediju s IL-12 (50 pg/ml) (n=11) značajno više ubijaju NK osjetljive K-562 stanice u odnosu na decidualne limfocite izdvojene iz suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih samo u mediju (n=23) ( $p < 0,05$  u svim omjerima izvršnih i ciljnih stanica) (Slika 4.5). Suprotno Th1 citokinima IL-2 i IL-12, citokin IL-10, koji pripada u grupu Th2 citokina, u ispitivanoj koncentraciji od 5 ng/ml nije značajno mijenjao citolitičku aktivnost decidualnih limfocita tijekom 18 sati stimulacije *in vitro* (n=8) (Slika 4.6).

*Slika 4.4. Interleukin-2 (IL-2) na doza ovisan način povećava citoličku aktivnost decidualnih limfocita (DL) prema NK osjetljivim K-562 stanicama*

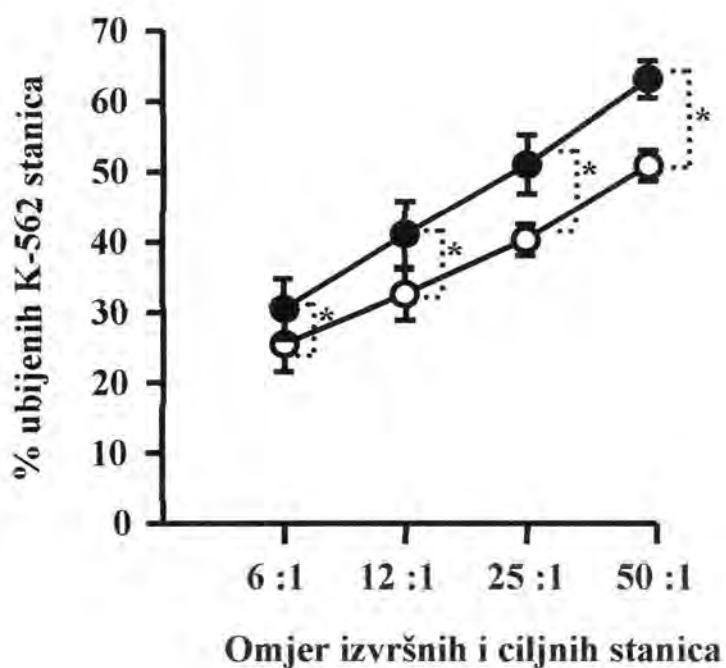


\*p < 0,05

- DL
- DL + IL-2 (100 i.j./ml)
- DL + IL-2 (1000 i.j./ml)

DL su izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononukleranih stanica kultiviranih 18 sati samo u mediju ili u mediju s IL-2.

**Slika 4.5. Interleukin-12 (IL-12) povećava citoličku aktivnost decidualnih limfocita (DL) prema NK osjetljivim K-562 stanicama**



\*p < 0,05

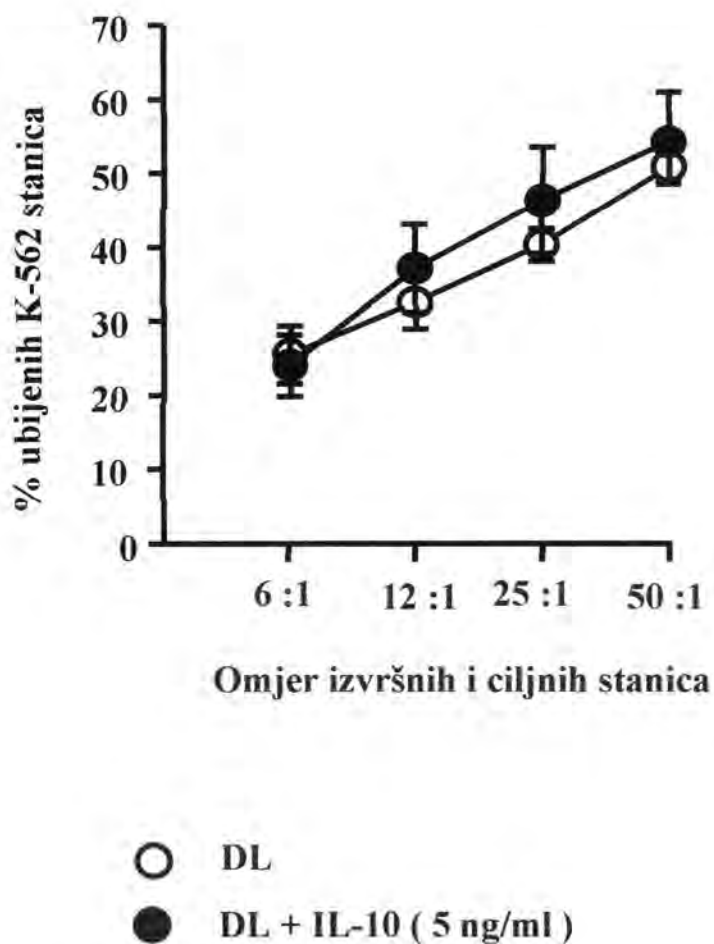
○ DL

● DL + IL-12 (50 ng/ml)

DL su izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati samo u mediju ili u mediju s IL-12.



*Slika 4.6. Interleukin-10 (IL-10) ne mijenja citoličku aktivnost decidualnih limfocita (DL) prema NK osjetljivim K-562 stanicama*



DL su izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati samo u mediju ili u mediju s IL-10.

### 4.3. Učinak progesterona na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita

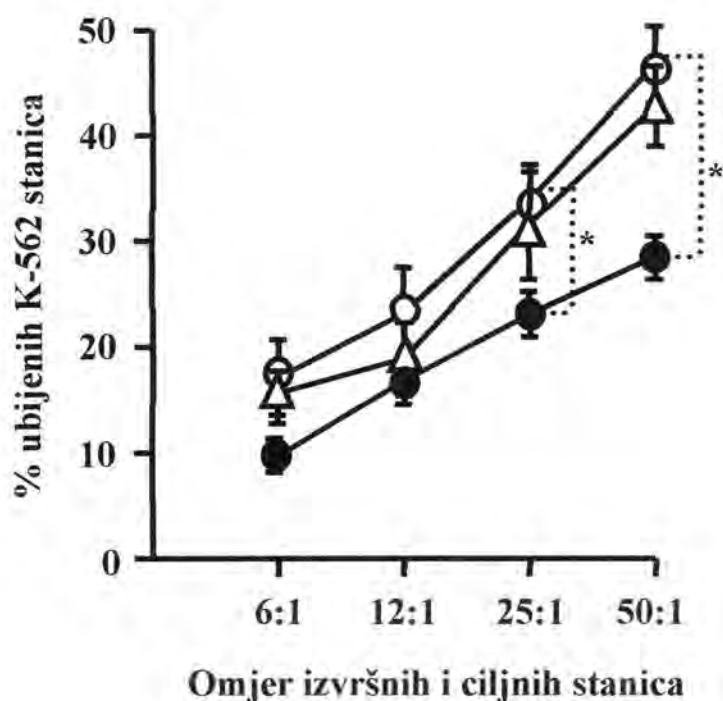
Mnoga do sada provedena istraživanja na životinjskim modelima i perifernoj krvi trudnice potvrdila su da progesteron pokazuje imunomodulacijske učinke u smislu potiskivanja imunološkog odgovora posredovanog stanicama. Stoga smo istraživali da li progesteron utječe na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita *in vitro*. Svježe izoliranu suspenziju decidualnih mononuklearnih stanica smo kultivirali tijekom 18 sati u prisustvu 5 (n=5) ili 10 µg/ml (n=12) progesterona, a citolitičku aktivnost decidualnih limfocita iz tih suspenzija uspoređivali sa citolitičkom aktivnosti decidualnih limfocita kultiviranih na isti način bez progesterona (n=23). Rezultate istraživanja prikazali smo grafički. Citolitička aktivnost decidualnih limfocita kultiviranih s K-562 ciljnim stanicama u prisustvu 10 µg/ml progesterona bila je niža ( $p < 0,05$  u omjeru izvršnih i ciljnih stanica 50:1 i 25:1), nego citolitička aktivnost decidualnih limfocita kultiviranih samo u mediju (Slika 4.7). Ovaj učinak progesterona bio je ovisan o koncentraciji hormona i uočen je samo u koncentraciji progesterona većoj od 5 µg/ml (Slika 4.7). Slika 4.8 ilustrira učinkovitost progesterona u koncentraciji od 10 µg/ml u omjeru izvršnih i ciljnih stanica 50:1 (Slika 4.8B) i 25:1 (Slika 4.8C) na jednom uzorku decidualnih limfocita. Histogrami pokazuju mrtve ciljne K-562 stanice kao postotak stanica obojenih propidium jodidom. Decidualni limfociti prethodno kultivirani u prisustvu progesterona pokazuju dvostruko nižu citolitičku aktivnost u oba omjera izvršnih i ciljnih stanica (28,7% vs 56,6% u omjeru 50:1, tj. 20,0% vs 42,0% u omjeru 25:1). Udio spontano mrtvih K-562 stanica u oba uzorka bio je manji od 5% (Slika 4.8A).

Kako bismo utvrdili molekularni mehanizam brze citolitičke aktivnosti koju koriste decidualni limfociti protiv K-562 stanica analizirali smo sadržaj citolitičkog proteina perforina u suspenzijama decidualnih limfocita prije i nakon dvosatnog testa citotoksičnosti. Određivali smo postotak perforin pozitivnih stanica i prosječan sadržaj perforina po pojedinoj stanici ili AFI vrijednost (od eng. Average Fluorescence Intensity) (n=9-11). U suspenzijama nestimuliranih decidualnih limfocita postotak perforin pozitivnih stanica se statistički značajno smanjio nakon dvosatnog testa citotoksičnosti ( $p < 0,05$ ) (Slika 9A). Tako na početku testa udio perforin pozitivnih stanica iznosi oko 40%, a na kraju dvosatnog testa citotoksičnosti se smanjuje na vrijednosti nešto ispod 30%. Za razliku od toga, postotak perforin pozitivnih stanica u suspenzijama decidualnih limfocita kultiviranih u prisustvu 10 µg/ml progesterona nije

se značajnije mijenjao i iznosi oko 40% i na kraju testa citotoksičnosti (Slika 4.9A). Prosječan broj molekula citolitičkog medijatora perforina po pojedinoj stanici ili AFI vrijednost nije se značajnije mijenjala u suspenziji nestimuliranih, kao ni u suspenziji decidualnih limfocita stimuliranih progesteronom tijekom dvosatnog testa citotoksičnosti (Slika 4.9B). Međutim AFI vrijednost na kraju dvosatnog testa citotoksičnosti u omjeru izvršnih i ciljnih stanica 50:1 je statistički značajno veća u suspenziji decidualnih limfocita kultiviranih s progesteronom u odnosu na AFI vrijednost decidualnih limfocita kultiviranih samo u mediju (Slika 4.9B).

Analiza perforin proteina u suspenziji limfocita prije i nakon testa citotoksičnosti je ukazivala da nestimulirani decidualni limfociti ubijaju K-562 stanice perforinom, stoga smo istraživali učinak blokatora vezikularnog transporta-concanamicina A na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita. Iz suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati u mediju za kulturu tkiva izdvojeni su decidualni limfociti i inkubirani daljnja dva sata s concanamicinom A (n=5). Decidualni limfociti tretirani sa concanamicinom A značajno su manje ubijali K-562 ciljne stanice u dvosatnom testu citotoksičnosti u usporedbi sa decidualnim limfocitima netretiranim concanamicinom A ( $p < 0,05$  u omjeru izvršnih i ciljnih stanica 50:1) (Slika 4.10).

**Slika 4.7. Progesteron na doza ovisan način smanjuje citolitičku aktivnost decidualnih limfocita (DL) prema NK osjetljivim K-562 stanicama**



\*p < 0,05

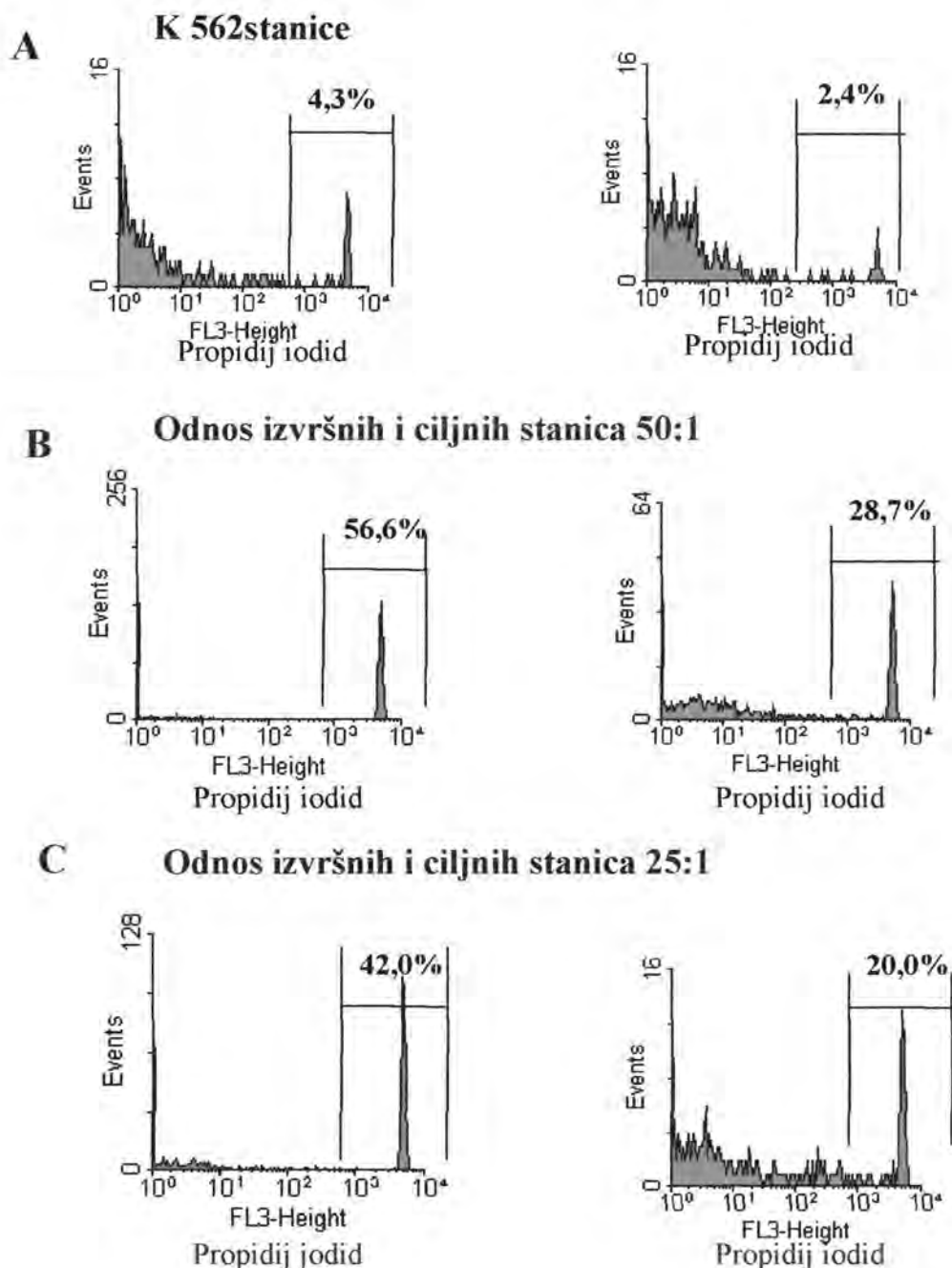
- DL
- △ DL + progesteron (5 µg/ml)
- DL + progesteron (10 µg/ml)

DL su izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati u prisustvu progesterona ili samo u mediju

**Slika 4.8.** Primjer analize ubijenih K-562 ciljnih stanica protočnim citometrom u 2 satnom PKH-26 testu citotoksičnosti. Ubijene stanice jesu obilježene propidijum jodidom. Red A predstavlja spontanu smrt K-562 stanica; red B predstavlja ubijene stanice u odnosu izvršnih i ciljnih stanica 50:1, a red C 25:1. U lijevom stupcu izvršne stanice jesu decidualni limfociti (DL) kultivirani u mediju, a u desnom stupcu DL prethodno stimulirani 18 sati progesteronom.

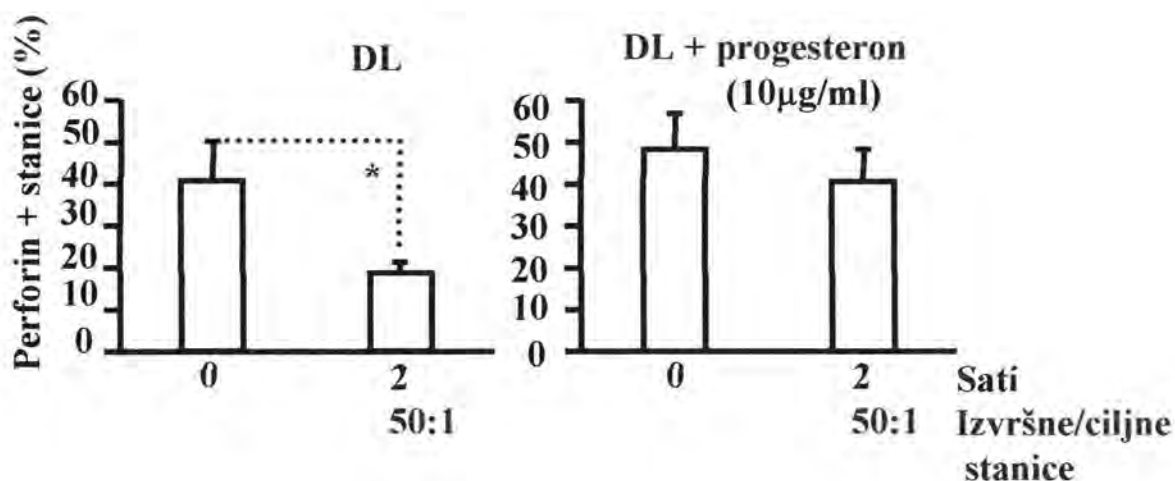
DL kultivirani u mediju

DL stimulirani progesteronom (10 µg/ml)



**Slika 4.9. Analiza udjela perforin pozitivnih stanica (A) i prosječnog sadržaja perforina po pojedinoj stanici (AFI #) (B) tijekom dvosatnog testa citotoksičnosti u suspenzijama decidualnih limfocita (DL) kultiviranih samo u mediju ili u prisustvu progesterona**

**A) Perforin+ stanice**



**B) AFI # za perforin**

	0h	2h 50:1
<b>DL</b>	29,47 <sup>a</sup> ± 13,54 <sup>b</sup>	22,66 ± 14,72 ..... *
<b>DL + progesteron (10 µg/ml)</b>	35,80 ± 13,80	38,62 ± 16,71 ..... :

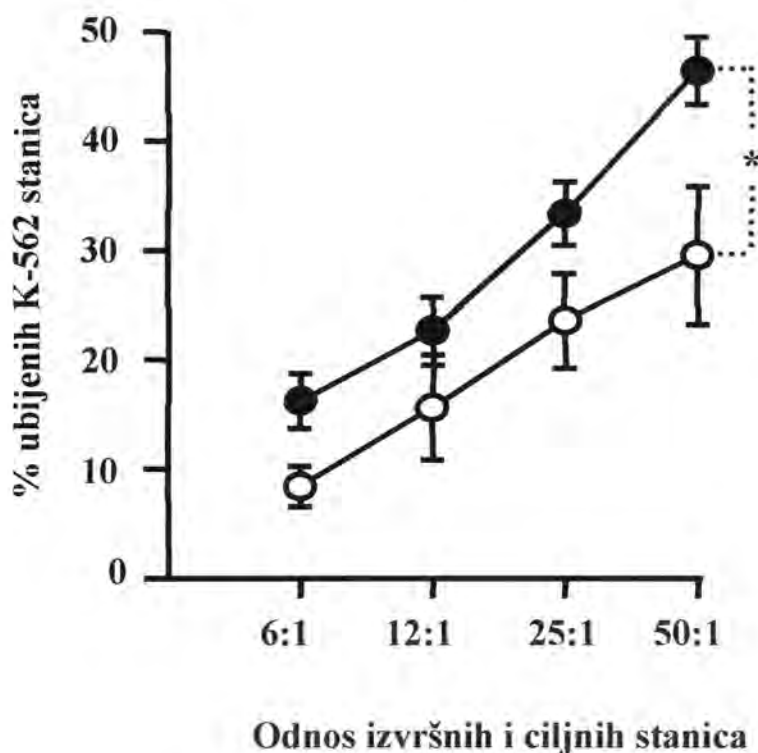
\*p < 0,05

# Average Fluorescence Intensity

<sup>a</sup> srednja vrijednost

<sup>b</sup> standardna devijacija

*Slika 4.10.* **Blokator vezikularnog transporta concanamycin A smanjuje citolitičku aktivnost decidualnih limfocita (DL) prema K562 staničnoj liniji**



\*p < 0,05

- DL
- DL + concanamycin A (100 nM)

DL su izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati samo u mediju, od kojih je dio 2 sata stimuliran concanamycinom A neposredno prije testa citotoksičnosti

#### 4.4. Učinak progesteronom induciranog blokirajućeg faktora (PIBF) na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita

Progesteron u perifernoj krvi trudnice ostvaruje svoja imunomodulacijska svojstva putem proteinskog medijatora PIBF. Pod djelovanjem progesterona u trudnoći dio limfocita periferne krvi, koji ispoljavaju receptor za progesteron, stvaraju medijator koji posreduje progesteronske učinke nazvan Progesteronom Inducirani Blokirajući Faktor (PIBF) i luče ga u plazmu.

Mi smo istraživali mogući učinak PIBF na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita *in vitro*. Decidualne mononuklearne stanice smo kultivirali tijekom 18 sati u mediju za kulturu tkiva bez PIBF (n=23) ili u prisutvu različitih koncentracija PIBF (1, 2, 5 µg/ml) (n=7-11), zatim smo izdvojili decidualne limfocite i postavili ih sa ciljnim K-562 stanicama u odgovarajuće omjere. Citolitička aktivnost nestimuliranih decidualnih limfocita je ponovno prikazana, kao kontrolna vrijednost i iznosi 20-40% idući od najmanjeg do najvećeg odnosa izvršnih i ciljnih stanica (Slika 4.11). Stimulacija decidualnih limfocita s PIBF u koncentraciji od 2 µg/ml statistički značajno je smanjila citolitičku aktivnost decidualnih limfocita prema K-562 ciljnim stanicama u omjeru ciljnih i izvršnih stanica 50:1 i 25:1 ( $p < 0,05$ ). Učinak PIBF ovisan je o koncentraciji. PIBF u koncentraciji 1 µg/ml smanjuje citolitičku aktivnost decidualnih limfocita, ali taj učinak nije statistički značajan, dok koncentracija PIBF od 5 µg/ml pokazuje gotovo identično smanjenje citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita kao koncentracija PIBF od 2 µg/ml (Slika 4.11). PIBF u koncentraciji 5ng/ml statistički značajno smanjuje citolitičku aktivnost decidualnih limfocita u omjeru izvršnih i ciljnih stanica 50:1 ( $p < 0,05$ ) u odnosu na citolitičku aktivnost nestimuliranih decidualnih limfocita.

Da bismo bar djelomice istražili citolitički mehanizam analizirali smo postotak perforin pozitivnih stanica i prosječan broj molekula perforina po pojedinoj izvršnoj stanici (AFI vrijednost) (n=6-19). Udio perforin pozitivnih stanica na početku testa citotoksičnosti u PIBF stimuliranim ili nestimuliranim suspenzijama decidualnih limfocita nisu se značajno razlikovale i iznosile su oko 40% (Slika 4.12A), ali decidualni limfociti kultivirani u prisustvu PIBF imaju statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) prosječan broj molekula perforina po pojedinoj stanici ( $73,44 \pm 35,9$ ) u odnosu na decidualne limfocite iz nestimuliranih suspenzija ( $29,47 \pm 13,54$ ) (Slika 4.12B). Na kraju dvosatnog testa citotoksičnosti postotak perforin pozitivnih stanica u suspenziji decidualnih limfocita

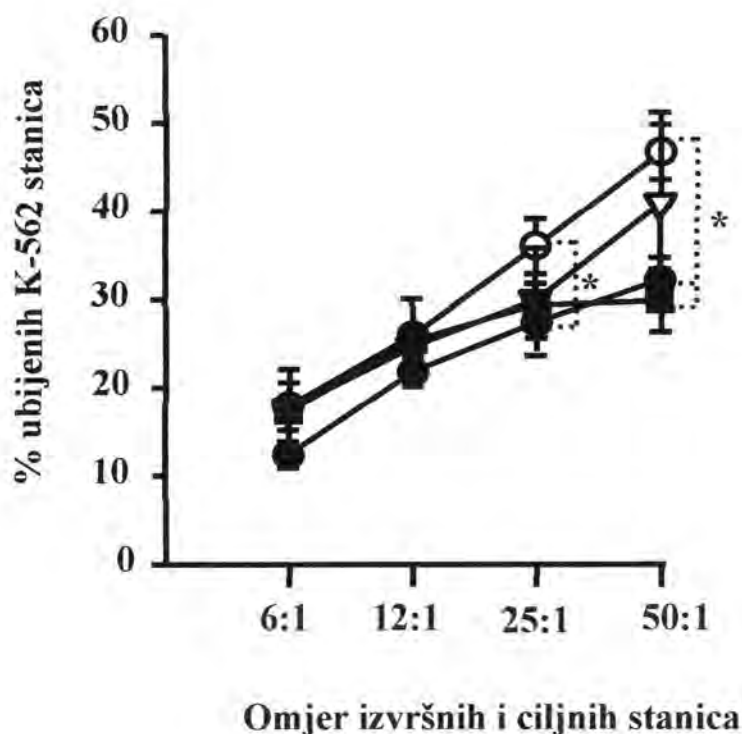


koji nisu stimulirani s PIBF se statistički značajno smanjio ( $p < 0,05$  u omjeru 50:1) u odnosu na postotak perforin pozitivnih stanica na početku testa i iznosio je oko 30% (Slika 4.12A). Suprotno ovim rezultatima, udio perforin pozitivnih stanica u suspenziji decidualnih limfocita kultiviranih u prisustvu 2  $\mu\text{g/ml}$  PIBF ostajao je stabilan tijekom dvosatnog testa citotoksičnosti da bi na kraju testa iznosio oko 40% (Slika 4.12A). Prosječan broj molekula perforina po stanici (AFI vrijednost) u nestimuliranim decidualnim limfocitima neznatno se smanjila tijekom dvosatnog testa citotoksičnosti (Slika 4.12B). AFI vrijednost za perforin u decidualnim limfocitima kultiviranim s 2  $\mu\text{g/ml}$  PIBF je na kraju testa citotoksičnosti iznosila  $93,79 \pm 31,80$  za razliku od AFI vrijednosti na početku testa, koja je iznosila  $73,44 \pm 35,9$  (Slika 4.12B). To povećanje nije bilo statistički značajno. Međutim, decidualni limfociti stimulirani s PIBF nakon dvosatnog kontakta s ciljnim K-562 stanicama u testu citotoksičnosti imaju prosječan broj molekula perforina po pojedinoj stanici statistički značajno veći ( $93,79 \pm 31,8$ ) od nestimuliranih decidualnih limfocita na kraju testa citotoksičnosti ( $22,66 \pm 14,72$ ) ( $p < 0,05$ ). S obzirom da progesteron i PIBF smanjuju citolitičku aktivnost decidualnih limfocita prema NK osjetljivim K-562 stanicama, analizirali smo spontanu smrtnost izvršnih stanica–decidualnih limfocita u različitim uvjetima kulture. Na taj način željeli isključiti mogućnost da je smanjenje citolitičke aktivnosti posljedica velike smrtnosti izvršnih stanica. Spontana smrtnost decidualnih limfocita prikazana je u grafu na Slici 4.13 kao postotak propidium jodidom obilježenih stanica. Smrtnost decidualnih limfocita izdvojenih iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati u prisustvu progesterona (10  $\mu\text{g/ml}$ ) ( $n=12$ ) ili PIBF (2  $\mu\text{g/ml}$ ) ( $n=11$ ) nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na smrtnost limfocita kultiviranih samo u mediju ( $n=23$ ) i iznosila je do 15% (Slika 4.13).

Kako smo u našim istraživanjima uočili da PIBF poput progesterona smanjuje citolitičku aktivnost decidualnih limfocita i nakuplja perforin u decidualnim limfocitima koji su u kontaktu s ciljnim stanicama interesiralo nas je da li PIBF posreduje učinke progesterona u regulaciji citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita. Tako smo istraživali učinak blokirajućih anti-PIBF antitijela na citolitičku aktivnost posredovanu progesteronom. Graf na Slici 4.14 ponovno prikazuje spontanu citolitičku aktivnost decidualnih limfocita kao kontrolnu vrijednost ( $n=23$ ) i značajno smanjenje citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita kultiviranih u prisutnosti 10  $\mu\text{g/ml}$  progesterona ( $n=12$ ). Progesteronom posredovana supresija citolitičke aktivnosti se potpuno uklanja

dodatkom anti-PIBF antitijela u suspenziji decidualnih limfocita kultiviranih u prisustvu progesterona (n=5) (Slika 4.14). Štoviše, decidualni limfociti kultivirani u prisustvu progesterona (10  $\mu\text{g/ml}$ ) i anti-PIBF antitijela (20  $\mu\text{g/ml}$ ) pokazuju višu citolitičku aktivnost od spontane citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita. Tako decidualni limfociti dvostruko stimulirani progesteronom i anti-PIBF antitijelima ubijaju 30-60% K-562 stanica u ovisnosti o omjeru izvršnih i ciljnih stanica, što predstavlja statistički značajan porast citolitičke aktivnosti u odnosu na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita kultiviranih u prisustvu progesterona (razina značajnosti iznosi  $p < 0,05$  za sve omjere izvršnih i ciljnih stanica (Slika 4.14).

**Slika 4.11. PIBF na doza ovisan način smanjuje citolitičku aktivnost decidualnih limfocita (DL) prema NK osjetljivim K-562 stanicama**



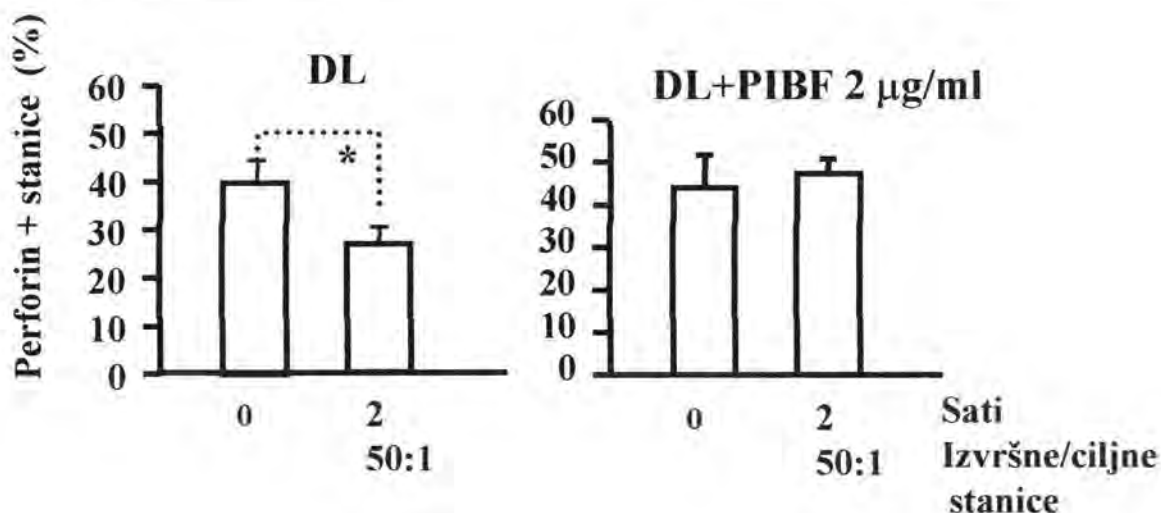
- DL
- △ DL + PIBF 1 µg/ml
- DL + PIBF 2 µg/ml
- DL + PIBF 5 µg/ml

\*p < 0,05

DL su izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati u prisustvu PIBF ili samo u mediju

**Slika 4.12. Analiza udjela perforin pozitivnih stanica (A) i prosječnog sadržaja perforina po pojedinoj stanici (AFI#) (B) tijekom dvosatnog testa citotoksičnosti u suspenzijama decidualnih limfocita (DL) kultiviranih u prisustvu progesteronom inducirano blokirajućeg faktora (PIBF) ili samo u mediju**

**A) Perforin+ stanice**



**B) AFI # za perforin**

	0h	2h 50:1
DL	29,47 <sup>a</sup> ± 13,54 <sup>b</sup> ...*	22,66 ± 14,72 ...*
DL + PIBF (2 µg/ml)	73,44 ± 35,90 ...	93,79 ± 31,80 ...

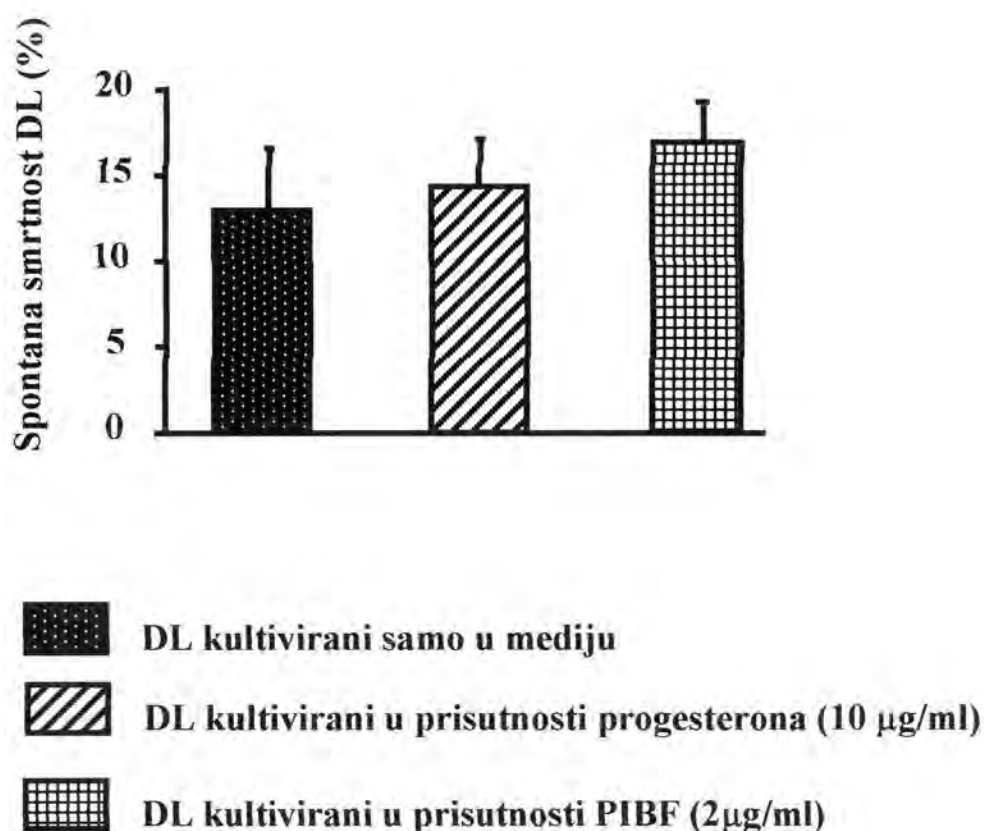
\*p < 0,05

# Average Fluorescence Intensity

<sup>a</sup> srednja vrijednost

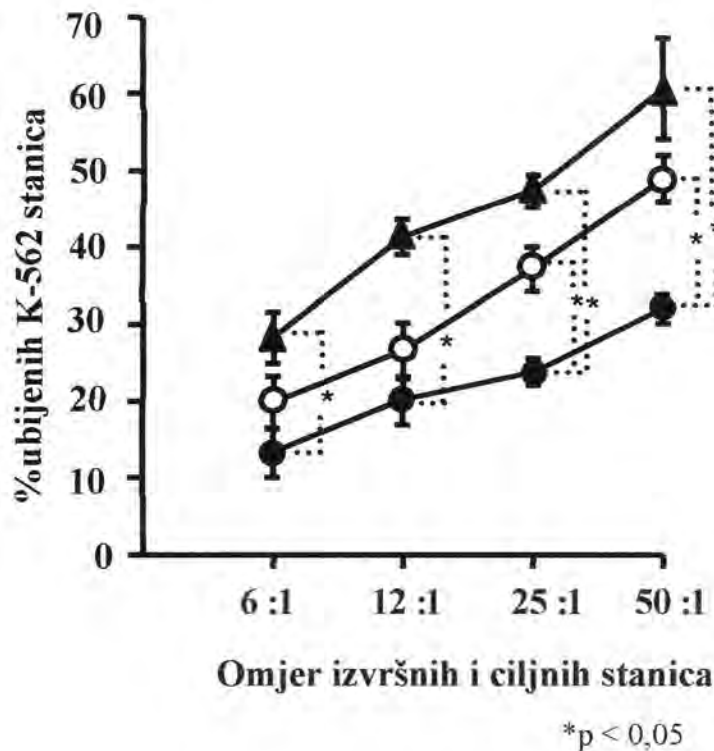
<sup>b</sup> standardna devijacija

*Slika 4.13. Usporedba spontane smrtnosti decidualnih limfocita (DL) nakon 18 sati kulture samo u mediju, u prisutnosti progesterona ili PIBF*



DL su izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati samo u mediju ili u prisutnosti progesterona ili PIBF

*Slika 4.14. Anti-PIBF antitijela uklanjaju progesteronom posredovano smanjenje citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita (DL) prema NK osjetljivim K-562 stanicama u dvosatnom testu citotoksičnosti*



- ▲ DL + progesteron (10 µg/ml) + αPIBF (20 µg/ml)
- DL
- DL + progesteron (10 µg/ml)

DL su izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati u prisustvu progesterona, progesterona i anti-PIBF antitijela ili samo u mediju

#### **4.5. Prisutnost i raspodjela progesteron induciranog blokirajućeg faktora (PIBF) i interleukina-15 u decidualnom tkivu prvog tromjesjeća normalne humane trudnoće**

Prethodno opisani rezultati su pokazali da progesteron *in vitro* utječe na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita na specifičan način putem PIBFa. Međutim, malo je podataka u literaturi o mogućim ulogama i raspodjeli PIBF u decidui. Stoga smo u slijedećoj seriji pokusa imunohistološki istraživali prisutnost PIBF u decidui prvog tromjesjeća normalne humane trudnoće. Decidualno tkivo uklopljeno u parafin obilježavali smo anti-PIBF antitijelima i utvrdili smo nazočnost velikog broja PIBF pozitivnih stanica (Slika 4.15B) u odnosu na izotipsku kontrolu (Slika 4.15A). Nadalje nas je interesiralo da li se PIBF nalazi u decidualnim limfocitima. Imunocitokemijskom metodom dvostrukog obilježavanja antigena utvrdili smo da se svježe izdvojeni decidualni limfociti obilježavaju istovremeno anti CD56 antitijelima (prikazano srebrno-crnom bojom) i anti-PIBF antitijelima (prikazano narančasto-crvenom bojom) (Slika 4.16). To dokazuje PIBF u decidualnim NK stanicama i daje im specifično obilježje.

Pored PIBF imunohistološki smo istraživali prisutnost i distribuciju IL-15 u humanoj decidui. Na smrznutim rezovima decidualnog tkiva prvog tromjesjeća humane trudnoće glatke mišićne stanice u stijenci decidualnih krvnih žila obilježavale su se s anti-IL-15 antitijelima (Slika 4.17B), kao i glatke mišićne stanice miometrija neposredno uz deciduu (Slika 4.17C). IgG1 izotipska kontrola bila je negativna (Slika 4.17A). Na istim rezovima decidualnog tkiva apikalni dijelovi pojedinih stanica žljezdanog epitela jasno su se prikazivali kao IL-15 pozitivni (Slika 4.18C) u usporedbi s negativnom kontrolom (Slika 4.18A). U stromi smrznutog decidualnog tkiva nalazili smo mnoštvo razasutih, ali slabo obilježenih IL-15 pozitivnih stanica (Slika 4.18B), te smo prisutnost IL-15 pozitivnih stanica u stromi decidue analizirali u tkivu uklopljenom u parafin. Koristili smo metodu imunohistologije uz prethodno razotkrivanje antigena zagrijavanjem tkiva u mikrovalnoj pećnici. U tako pripremljenim rezovima utvrdili smo puno difuzno raspoređenih IL-15 pozitivnih stanica u stromi decidue (Slika 4.19B), u odnosu na negativnu kontrolu (Slika 4.19A).

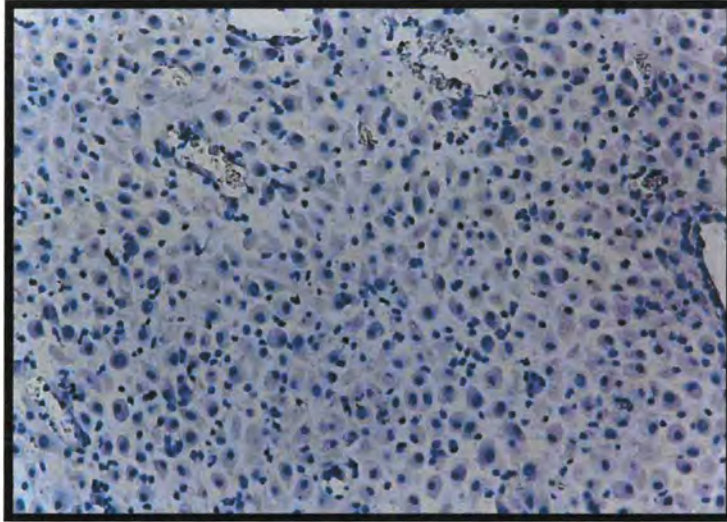
U suspenziji mononuklearnih stanica dobivenoj enzimatskom razgradnjom decidualnog tkiva i naslojavanjem dobivene suspenzije na gradijentu gustoće, kako je prethodno i opisano, pored decidualnih limfocita izolirali smo visoko viabilne decidualne

adherentne stanice. Unutarstaničnim obilježavanjem IL-15 u suspenziji decidualnih adherentnih stanica nakon 18 sati kulture *in vitro* i nakon dodatne stimulacije s PMA i ionomicinom tijekom 4 sata (n=7) utvrdili smo oko 35% IL-15 pozitivnih stanica u suspenziji (Slika 4.20). Naši prethodni rezultati su pokazali da se decidualne stanice sastoje od HLA-DR pozitivnih makrofaga i HLA-DR negativnih, uglavnom stromalnih stanica (356). Stoga smo decidualne adherentne stanice podvrgli dvostrukom obilježavanju unutarstaničnog bilijega IL-15 i površinskog bilijega HLA-DR molekule. Utvrdili smo da je oko 15% IL-15 pozitivnih decidualnih adherentnih stanica istovremeno i HLA-DR pozitivno, a preostalih 20% IL-15 pozitivnih stanica prikazale su se kao HLA-DR negativne stanice (Slika 4.20).

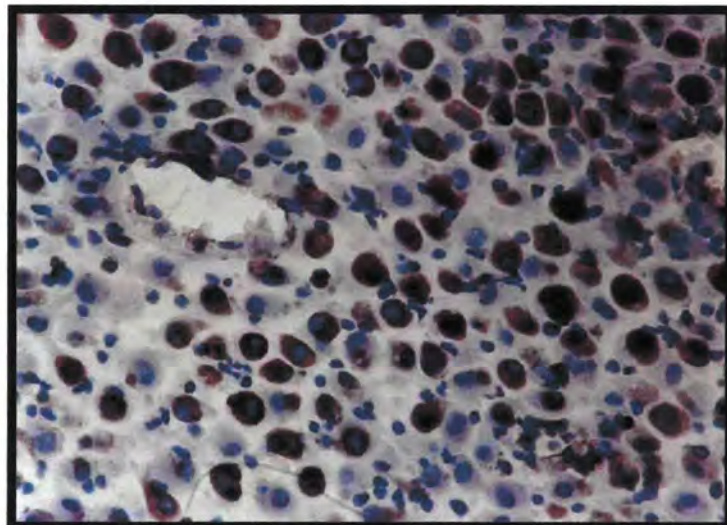


**Slika 4.15. Raspodjela PIBF<sup>+</sup> stanica u parafin uklopljenom decidualnom tkivu prvog trimestra normalne humane trudnoće**

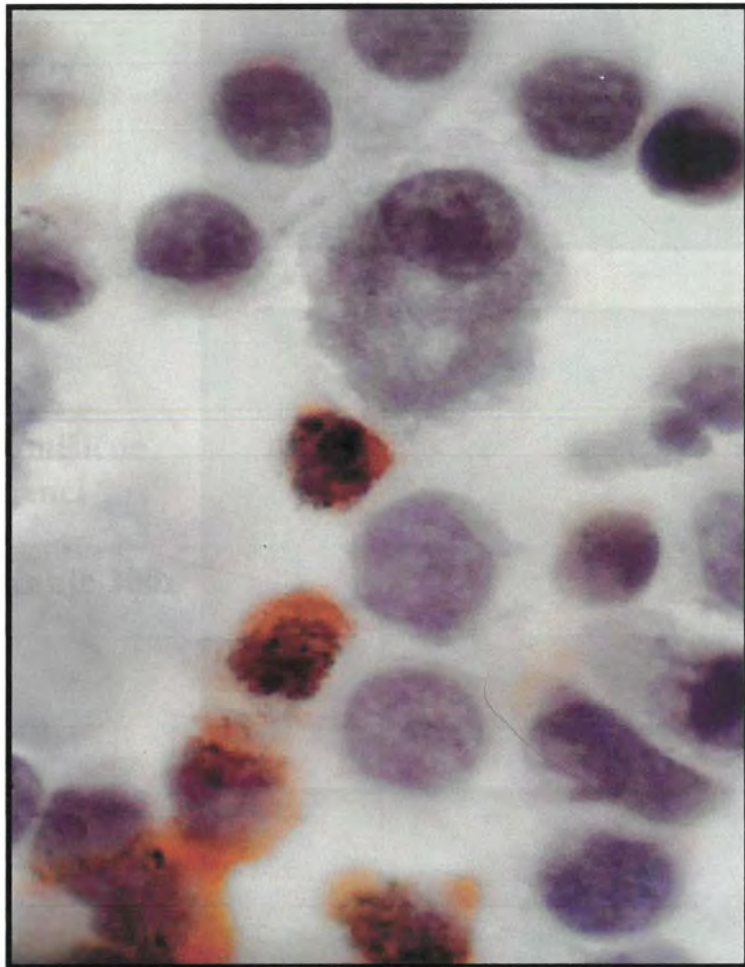
**A, negativna kontrola, izvorno povećanje 200x**



**B, PIBF<sup>+</sup> stanice, izvorno povećanje 400x**

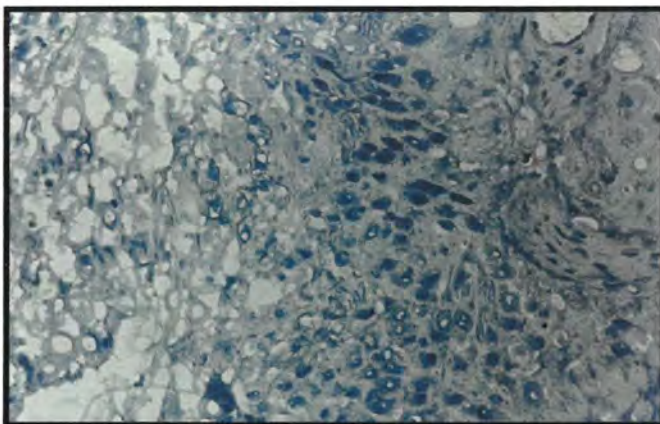


***Slika 4.16. Svježe izdvojeni decidualni limfociti (DL) obilježeni anti-CD56 (srebrno) i anti-PIBF (AEC) antitijelima; izvorno povećanje 1000x***

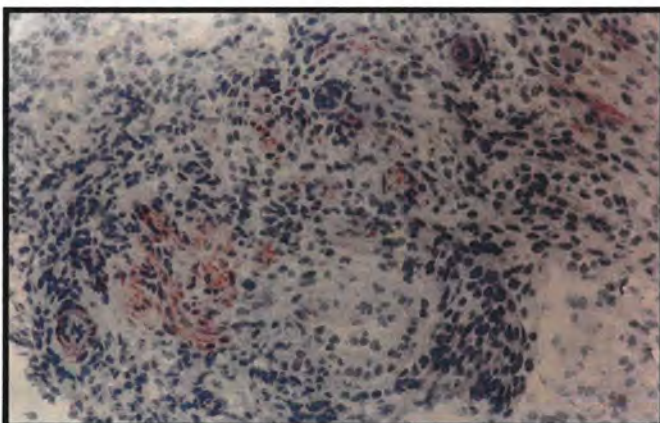


**Slika 4.17. Imunohistološko obilježavanje IL-15 na smrznutim decidualnim rezovima prvog tromjesečja normalne humane trudnoće**

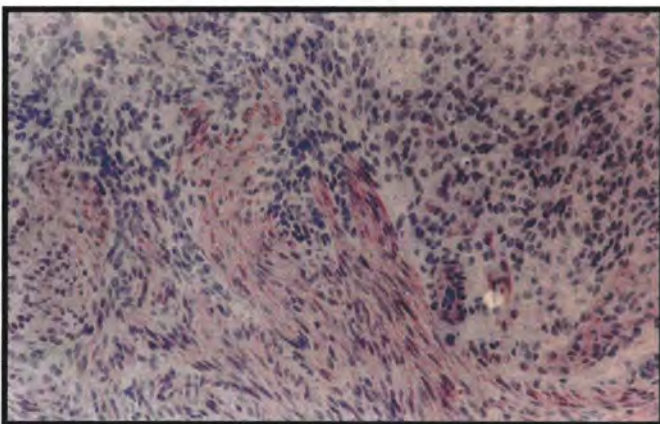
**A,  
negativna kontrola,  
IgG1, izvorno  
povećanje 400x**



**B,  
IL-15<sup>+</sup> glatke mišićne  
stanice u stijenci  
krvnih žila,  
izvorno povećanje 200x**

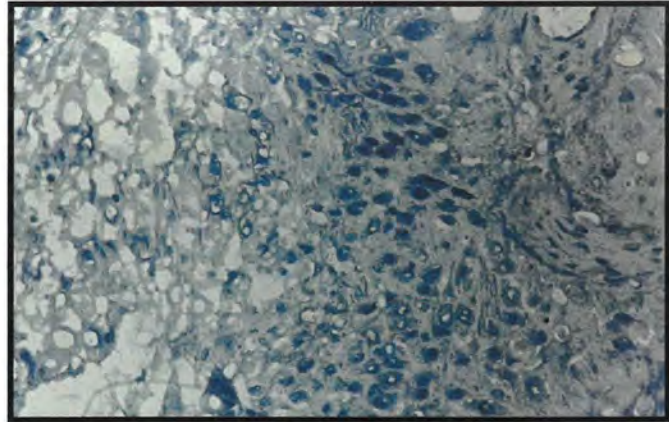


**C,  
IL-15<sup>+</sup> glatke mišićne  
stanice miometrija,  
izvorno povećanje 200x**

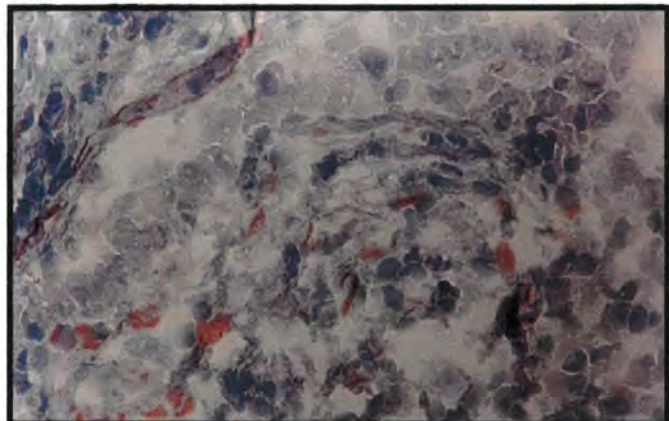


**Slika 4.18. Imunohistološko obilježavanje IL-15 na smrznutim decidualnim rezovima prvog tromjesečja normalne humane trudnoće**

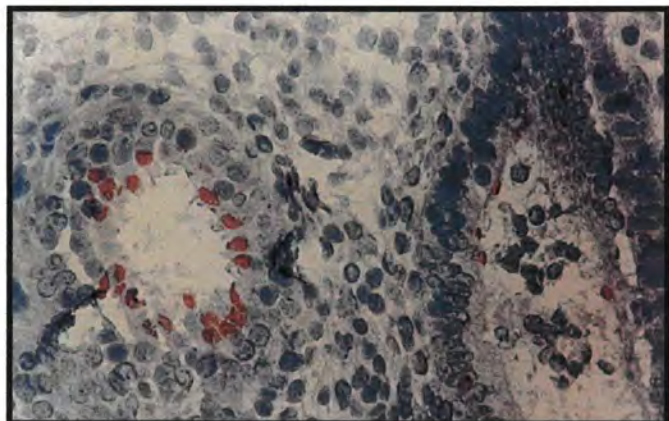
**A,  
negativna kontrola,  
IgG1, izvorno  
povećanje 400x**



**B,  
IL-15<sup>+</sup> stanice  
difuzno raspoređene  
u stromi, izvorno  
povećanje 400x**

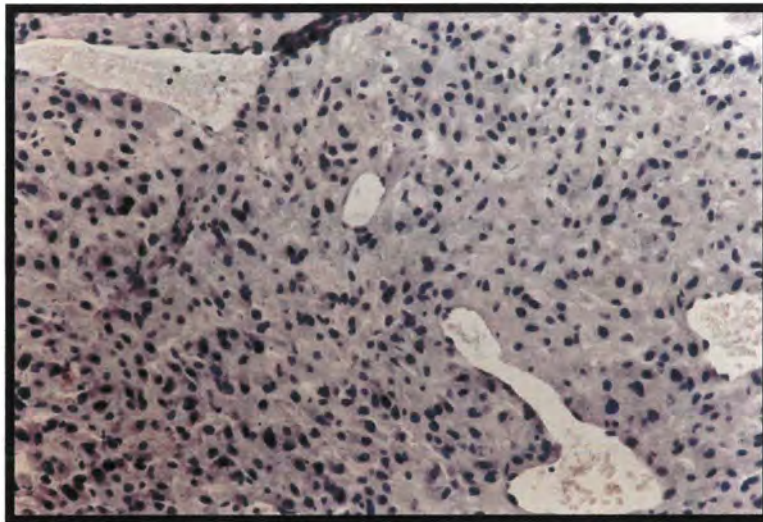


**C,  
IL-15<sup>+</sup> stanice  
žljeđanog epitela,  
izvorno povećanje  
400x**

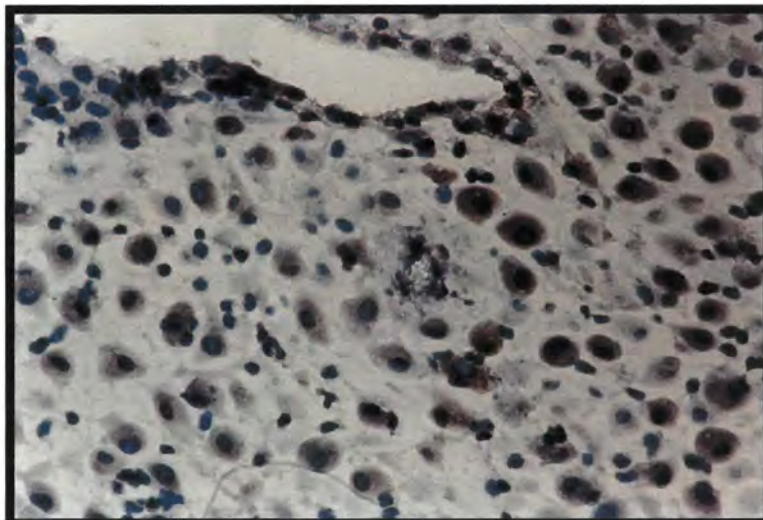


**Slika 4.19. Raspodjela IL-15<sup>+</sup> stanica u parafin uklopljenom decidualnom tkivu prvog tromjesečja normalne humane trudnoće**

**A,**  
negativna kontrola, izvorno povećanje 200x

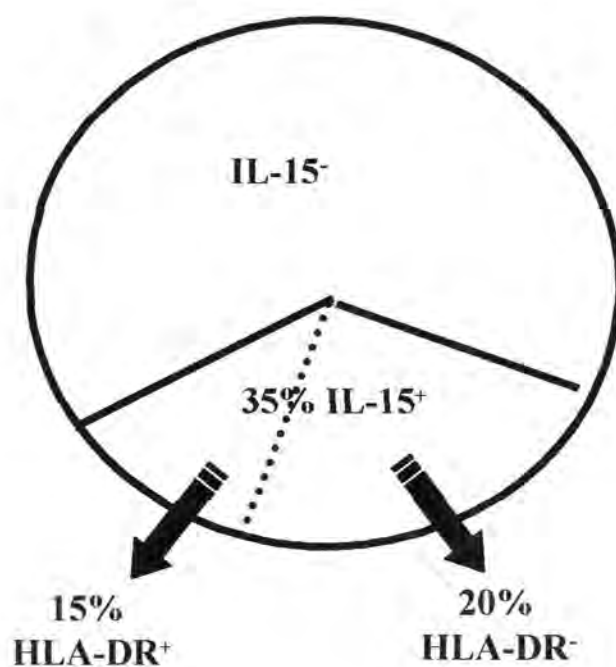


**B,**  
IL-15<sup>+</sup> stanice, izvorno povećanje 400x



**Slika 4.20. Udio IL-15<sup>+</sup> stanica i njihovih subpopulacija (HLA-DR<sup>+</sup> i HLA-DR<sup>-</sup>) u suspenziji decidualnih adherentnih stanica (DAC)**

**Decidualne adherentne stanice**



**DAC su izdvojene iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica nakon 18 sati kulture *in vitro***

#### 4.6. Učinci interleukina-15 na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita i međudjelovanje interleukina-15 i progesterona

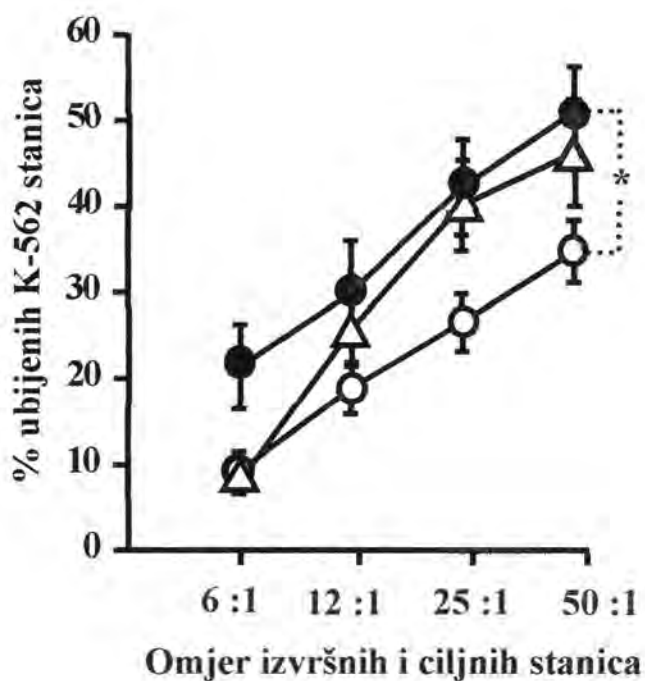
Progesteron je hormon koji se tijekom trudnoće luči u velikim količinama na dodirnoj plohi između majčinih i fetalnih tkiva. Pored progesterona decidualno tkivo prvog trimestra normalne humane trudnoće sadrži u značajnim količinama i IL-15. IL-15 je glavni proliferacijski i diferencijski čimbenik NK stanica i smatra se da zamjenjuje IL-2 u regulaciji citolitičke aktivnosti NK stanica u tkivima siromašnim s IL-2, kao što je i decidua. Stoga smo istraživali učinak IL-15 na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita. Decidualne mononuklearne stanice kultivirali smo 72 sata s 2 ili 5 ng/ml IL-15 ili samo u mediju (n=5-8). Citolitička aktivnost decidualnih limfocita kultiviranih samo u mediju iznosila je od 10% – 30% ubijenih stanica u rasponu izvršnih i ciljnih stanica od 6:1 do 50:1 (Slika 4.21), što je predstavljalo kontrolnu vrijednost. IL-15 je tijekom 72 sata u koncentraciji od 2 ng/ml povećao citolitičku aktivnost decidualnih limfocita prema K-562 ciljevima, ali je povećanje citolitičke aktivnosti postalo statistički značajno tek u koncentraciji IL-15 od 5 ng/ml ( $p < 0,05$ ) (Slika 4.21). Decidualni limfociti stimulirani 72 sata s 5 ng/ml IL-15 ubijali su oko 50% ciljnih K-562 stanica u omjeru 50:1. Da bismo utvrdili da li perforin uzrokuje povećanje citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita stimuliranih s IL-15, tretirali smo decidualne limfocite s concanamycinom A tijekom 2 sata neposredno prije postavljanja s ciljnim stanicama u test citotoksičnosti (n=5). Concanamicin A, kao blokator vezikularnog transporta je snažno blokirao citolitičku aktivnost decidualnih limfocita prethodno stimuliranih s 5 ng/ml IL-15 ( $p < 0,05$  u svim istraživanim omjerima izvršnih i ciljnih stanica 50:1) (Slika 4.22). U odnosu izvršnih i ciljnih stanica 50:1 citolitička aktivnost decidualnih limfocita tretiranih s concanamycinom A bila je svega oko 20% za razliku od decidualnih limfocita stimuliranih samo s 5 ng/ml IL-15, koji su ubijali oko 50% ciljnih stanica (Slika 4.22). Učinak IL-15 na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita ne ovisi samo o koncentraciji citokina, nego i o vremenu trajanja stimulacije *in vitro*. Decidualni limfociti izdvojeni iz suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih samo u mediju nakon 72 sata (n=6) pokazuju nižu citolitičku aktivnost, nego decidualni limfociti izdvojeni iz suspenzije decidualnih stanica nakon 18 sati kulture (n=23) ( $p < 0,05$  u omjeru 50:1) (Slika 4.23). Stimulacija decidualnih limfocita s 5 ng/ml IL-15 tijekom 18 sati (n=12) nije značajno promijenila citolitičku aktivnost decidualnih limfocita prema K-562 ciljevima u odnosu na kontrolne decidualne

limfocite kultivirane 18 sati samo u mediju (Slika 4.23). Za razliku od osamnaestsatne stimulacije s IL-15, stimulacija decidualnih limfocita s 5 ng/ml IL-15 tijekom 72 sata (n=6) značajno je povećala citolitičku aktivnost decidualnih limfocita u odnosu na citolitičku aktivnost kontrolnih decidualnih limfocita kultiviranih 72 sata samo u mediju ( $p < 0,05$  u omjeru 50:1) (Slika 4.23). Interesantno da dugotrajna stimulacija decidualnih limfocita tijekom 72 sata s IL-15 povećava, ali ne može premašiti citolitičku aktivnost decidualnih limfocita kultiviranih 18 sati samo u mediju (Slika 4.23).

Kako su naši rezultati pokazali da IL-15 i progesteron djeluju suprotno na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita, a obje molekule nalazimo u decidui normalne trudnoće u visokim koncentracijama, istraživali smo da li postoji međudjelovanje između progesterona i IL-15 u regulaciji citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita. Rezultate smo prikazali na Slici 4.24, gdje je prikazana spontana citolitička aktivnost (n=23) i progesteronom posredovano smanjenje citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita (n=12) nakon 18 satne kulture *in vitro*. Na Slici 4.24 se također vidi da IL-15 tijekom 18 sati ne može značajno povećati citolitičku aktivnost decidualnih limfocita (n=12). Međutim, decidualni limfociti stimulirani istovremeno s progesteronom (10  $\mu\text{g/ml}$ ) i IL-15 (5 ng/ml) (n=6) tijekom 18 sati statistički značajno povećavaju citolitičku aktivnost prema K-562 stanicama u odnosu na decidualne limfocite stimulirane samo s progesteronom ( $p < 0,05$  za omjer 50:1 i 25:1). IL-15 u koncentraciji od 5 ng/ml već nakon 18 sati kulture također uklanja PIBF posredovano smanjenje citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita (n=5) (Slika 4.25). Tako decidualni limfociti stimulirani istovremeno s 5  $\mu\text{g/ml}$  PIBF i 5 ng/ml IL-15 jače ubijaju K-562 stanice u odnosu na decidualne limfocite stimulirane samo s PIBF ( $p < 0,05$  za omjer 50:1) (Slika 4.25).



**Slika 4.21. Interleukin-15 (IL-15) na doza ovisan način povećava citolitičku aktivnost decidualnih limfocita (DL) prema NK osjetljivim K-562 stanicama**



\*p < 0,05

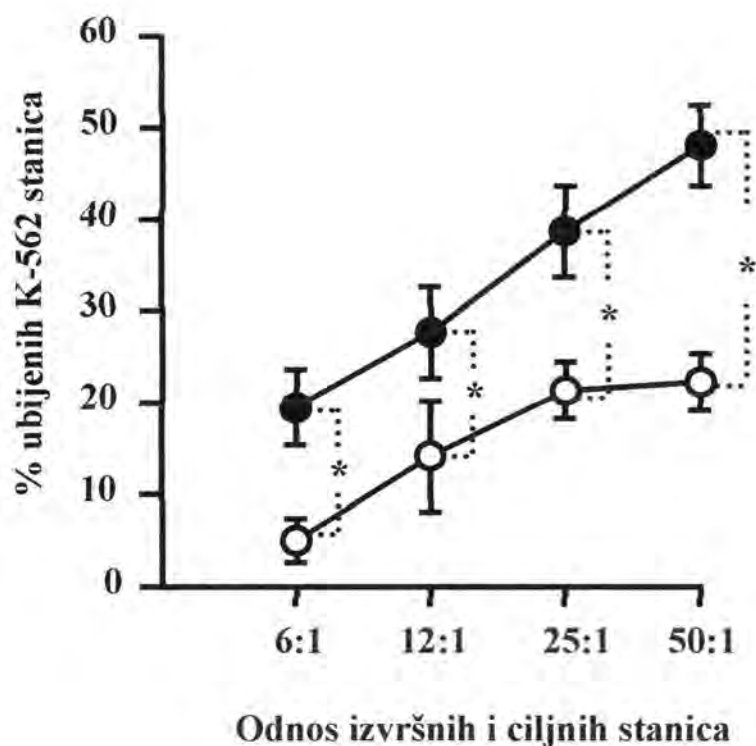
○ DL

△ DL + IL-15 (2 ng/ml)

● DL + IL-15 (5 ng/ml)

DL su izdvojeni iz suspenzija decidualnih stanica kultiviranih 72 sata samo u mediju ili u mediju s IL-15.

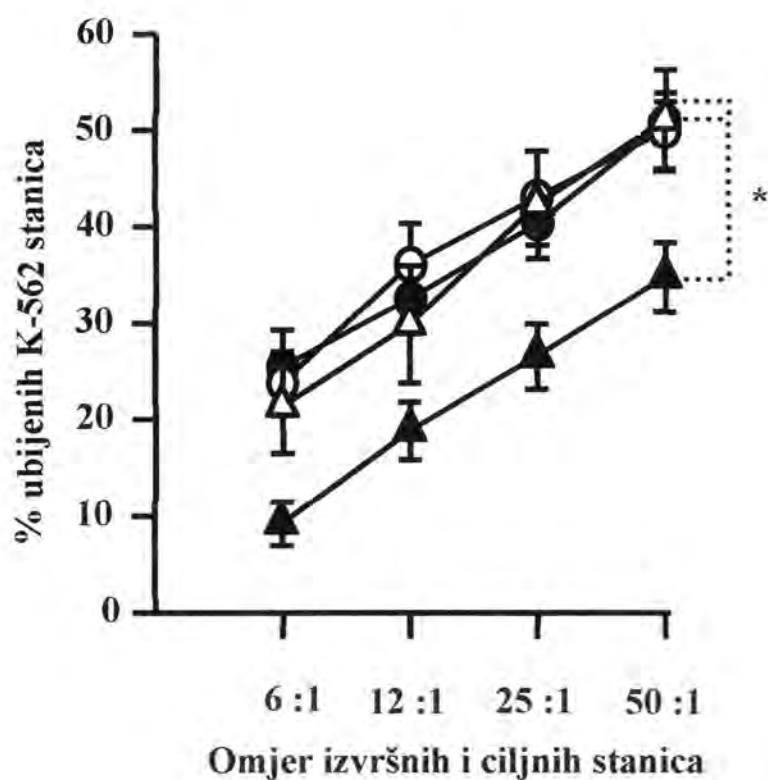
*Slika 4.22. Blokator vezikularnog transporta concanamicin A smanjuje citolitičku aktivnost interleukinom-15 stimuliranih decidualnih limfocita (DL) prema K-562 staničnoj liniji*



\*p < 0,05

- DL stimulirani 72 sata s IL-15 (5 ng/ml)
- DL stimulirani 72 sata s IL-15 (5 ng/ml) + concanamicin A (100 nM)

**Slika 4.23. Interleukin-15 (IL-15) tijekom 18 sati ne utječe, ali tijekom 72 sata povećava citolitičku aktivnost decidualnih limfocita (DL) prema NK osjetljivoj K-562 staničnoj liniji, u odnosu na DL kultivirane samo u mediju tijekom 18, odnosno 72 sata**

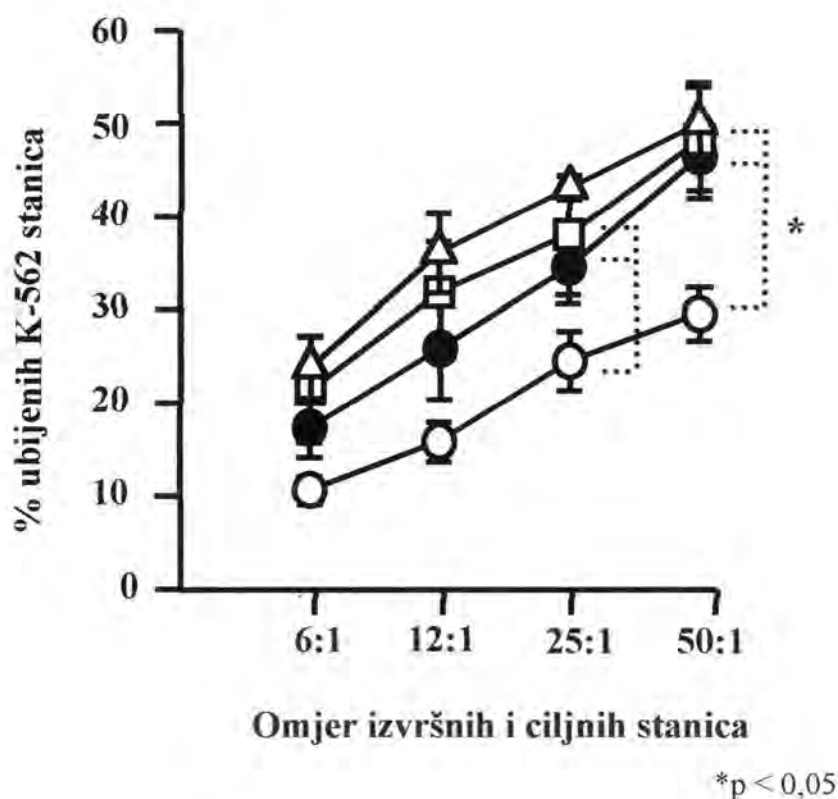


\*p < 0,05

- DL 18 sati
- DL + IL-15 (5 ng/ml) 18 sati
- ▲ DL 72 sata
- △ DL + IL-15 (5 ng/ml) 72 sata

DL su izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 ili 72 sata samo u mediju ili u mediju s IL-15.

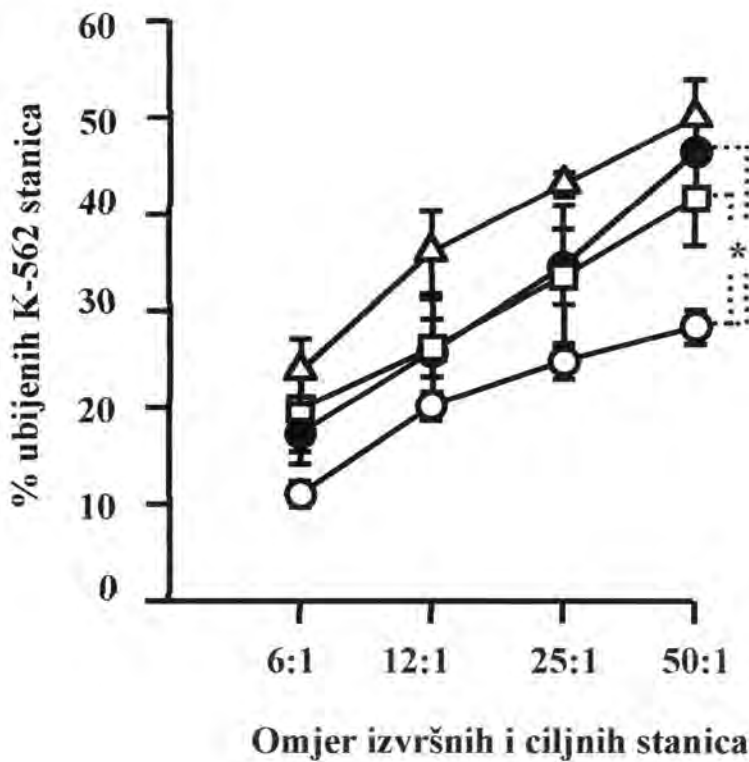
**Slika 4.24. Interleukin-15 (IL-15) uklanja progesteronom posredovano smanjenje citoličke aktivnosti decidualnih limfocita (DL) prema NK osjetljivim K-562 stanicama**



- DL
- DL + progesteron (10 µg/ml)
- △ DL + IL-15 (5 ng/ml)
- DL + progesteron (10 µg/ml) + IL-15 (5 ng/ml)

DL su izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati u prisustvu progesterona, progesterona i IL-15 ili samo u mediju

*Slika 4.25. Interleukin-15 (IL-15) uklanja smanjenje citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita (DL) posredovano progesteron induciranim blokirajućim faktorom (PIBF) prema NK osjetljivoj K-562 staničnoj liniji*



\*p < 0,05

- DL
- DL + PIBF (5 µg/ml)
- △ DL + IL-15 (5 ng/ml)
- DL + PIBF (5 µg/ml) + IL-15 (5 ng/ml)

DL su izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati u prisustvu PIBF, PIBF i IL-15 ili samo u mediju

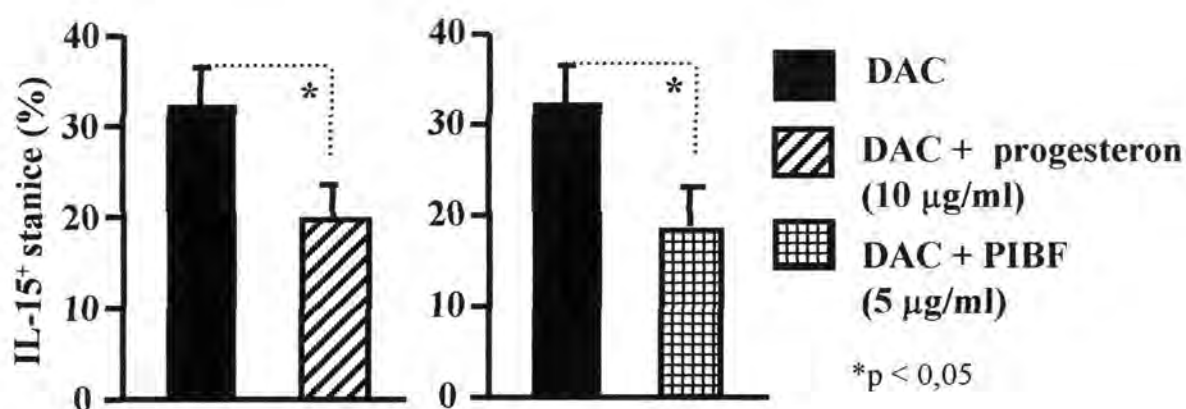
#### **4.7. Učinak progesterona i progesteronom induciranog blokirajućeg faktora (PIBF) na regulaciju izražavanja interleukina-15 u decidualnim adherentnim stanicama**

Prethodno opisani rezultati pokazuju da IL-15, egzogeno dodan u kulturu decidualnih stanica, uklanja progesteronom posredovano smanjenje citotoksičnosti decidualnih limfocita prema K-562 stanicama. Stoga smo istraživali moguću ulogu progesterona i njegova medijatora PIBF na unutarstanično ispoljavanje IL-15 u decidualnim adherentnim stanicama. Uspoređivali smo udio IL-15 pozitivnih stanica u suspenziji decidualnih adherentnih stanica izdvojenih iz kultura decidualnih mononuklearnih stanica stimuliranih 18 sati s progesteronom ili PIBF s udjelom IL-15 pozitivnih stanica iz suspenzija kultiviranih samo u mediju (n=6-7). Udio IL-15 pozitivnih stanica u suspenziji nestimuliranih decidualnih adherentnih stanica iznosi oko 35% (Slika 4.26A). Taj udio se statistički značajno smanjuje u suspenzijama decidualnih adherentnih stanica kultiviranih u prisustvu 10 µg/ml progesterona ( $p < 0,05$ ) kada postotak IL-15 pozitivnih stanica iznosi oko 20%. Decidualne adherentne stanice kultivirane s 5 µg/ml PIBF sadrže također statistički značajno manji udio IL-15 pozitivnih stanica ( $p < 0,05$ ) u odnosu na nestimuliranu kontrolu (Slika 4.26A). Prosječan broj molekula IL-15 po pojedinoj stanici ili AFI vrijednost za IL-15 (eng. Average Fluorescence Intensity) u decidualnim adherentnim stanicama kultiviranim u prisutnosti progesterona ostaje gotovo nepromjenjena u odnosu na nestimulirane stanice (Slika 4.26B). Međutim, AFI za IL-15 u PIBF tretiranim decidualnim adherentnim stanicama statistički se značajno smanjuje u odnosu na nestimulirane decidualne adherentne stanice ( $p < 0,05$ ) (Slika 4.26B). Naša prethodna istraživanja su pokazala da se decidualne adherentne stanice sastoje velikim dijelom od HLA-DR negativnih stromalnih stanica i HLA-DR pozitivnih makrofaga (356). U našen daljnjem istraživanju željeli smo utvrditi u kojoj se od navedenih subpopulacija mijenja udio IL-15 pozitivnih stanica pod stimulacijom progesteronom ili PIBF. Decidualne adherentne stanice smo dvostruko obilježavali anti-IL-15 antitijelima radi otkrivanja IL-15 unutar stanice i anti-HLA-DR antitijelima radi otkrivanja površinske HLA-DR molekule, te analizirali protočnom citometrijom. U suspenziji decidualnih adherentnih stanica kultiviranih u mediju nalazimo oko 15% dvostruko pozitivnih IL-15<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> stanica (Slika 4.27). Udio dvostruko pozitivnih stanica se statistički značajno smanjuje u suspenziji decidualnih adherentnih stanica kultiviranih u prisustvu progesterona ili PIBF ( $p < 0,05$ ) u odnosu na decidualne

adherentne stanice kultivirane samo u mediju (Slika 4.27A). Prosječan broj molekula IL-15 po pojedinoj stanici (AFI za IL-15) nije se statistički značajno mijenjao u kulturama stanica stimuliranih s progesteronom i PIBF ili kultiviranih samo u mediju (Slika 4.27B). Slika 4.28 prikazuje primjer analize protočnim citometrom jednog uzorka decidualnih adherentnih stanica obilježenih anti-IL-15 i anti-HLA-DR antitijelima. Najveći postotak dvostruko pozitivnih stanica (13%) sa najvećim prosječnim sadržajem molekula IL-15 po pojedinoj stanici utvrdili smo u suspenziji decidualnih adherentnih stanica kultiviranih samo u mediju (Slika 4.28, Red A). U suspenziji decidualnih stanica kultiviranih s progesteronom udio IL-15<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> stanica se smanjuje na 8,78% (Slika 4.28, Red B), da bi se u suspenziji kultiviranoj u prisustvu 5 µg/ml PIBF smanjio samo 4,82% dvostruko pozitivnih stanica (Slika 4.28, Red C). Prosječan broj molekula IL-15 po pojedinoj stanici neznatno se smanjuje u suspenzijama stimuliranih s progesteronom ili PIBF (Slika 4.28). Za razliku od smanjenja udjela IL-15<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> makrofaga, udio IL-15<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> stromalnih stanica, kao niti prosječan broj molekula IL-15 po stanici u IL-15<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> subpopulaciji se ne mijenja statistički značajno nakon stimulacije progesteronom i PIBF u odnosu na stanice kultivirane samo u mediju (Slika 4.29).

**Slika 4.26. Progesteron i progesteronom induciran blokirajući faktor (PIBF) nishodno reguliraju izražavanje IL-15 u decidualnim adherentnim stanicama (DAC) tijekom 18 sati kulture *in vitro***

**A) Postotak IL-15<sup>+</sup> DAC**



**B) AFI<sup>#</sup> vrijednost za IL-15 u DAC**

AFI za IL-15 u DAC		
DAC	DAC + progesteron (10 µg/ml)	DAC +PIBF (5 µg/ml)
36,9±2,34 <sup>a</sup>	33,85±3,45	31,22±2,29

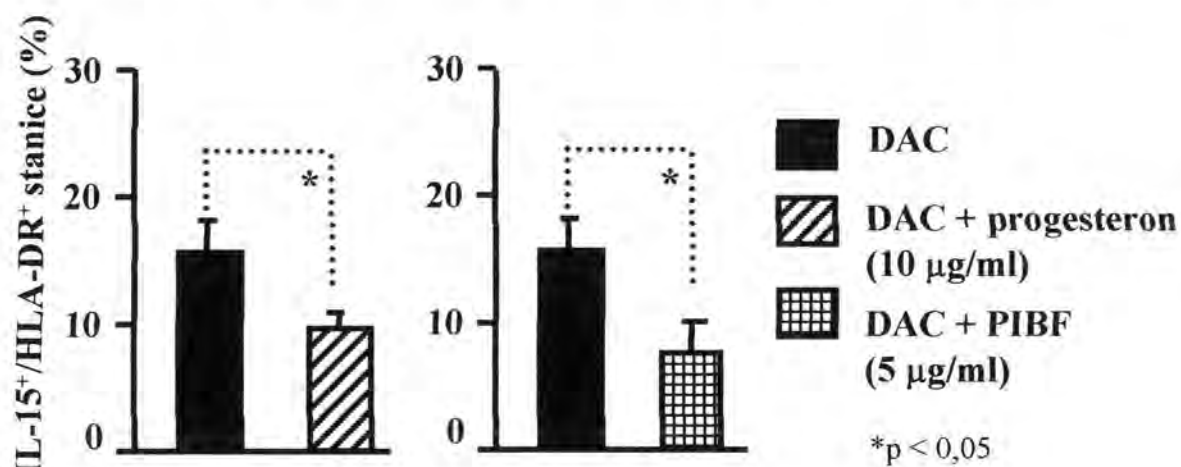
<sup>a</sup> Srednja vrijednost ± standardna devijacija

<sup>#</sup> Average Fluorescence Intensity



**Slika 4.27. Progesteron i progesteronom induciran blokirajući faktor (PIBF) nishodno reguliraju izražavanje IL-15 u decidualnim adherentnim HLA-DR<sup>+</sup> stanicama tijekom 18 sati kulture *in vitro***

**A) Postotak IL-15<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> decidualnih adherentnih stanica**



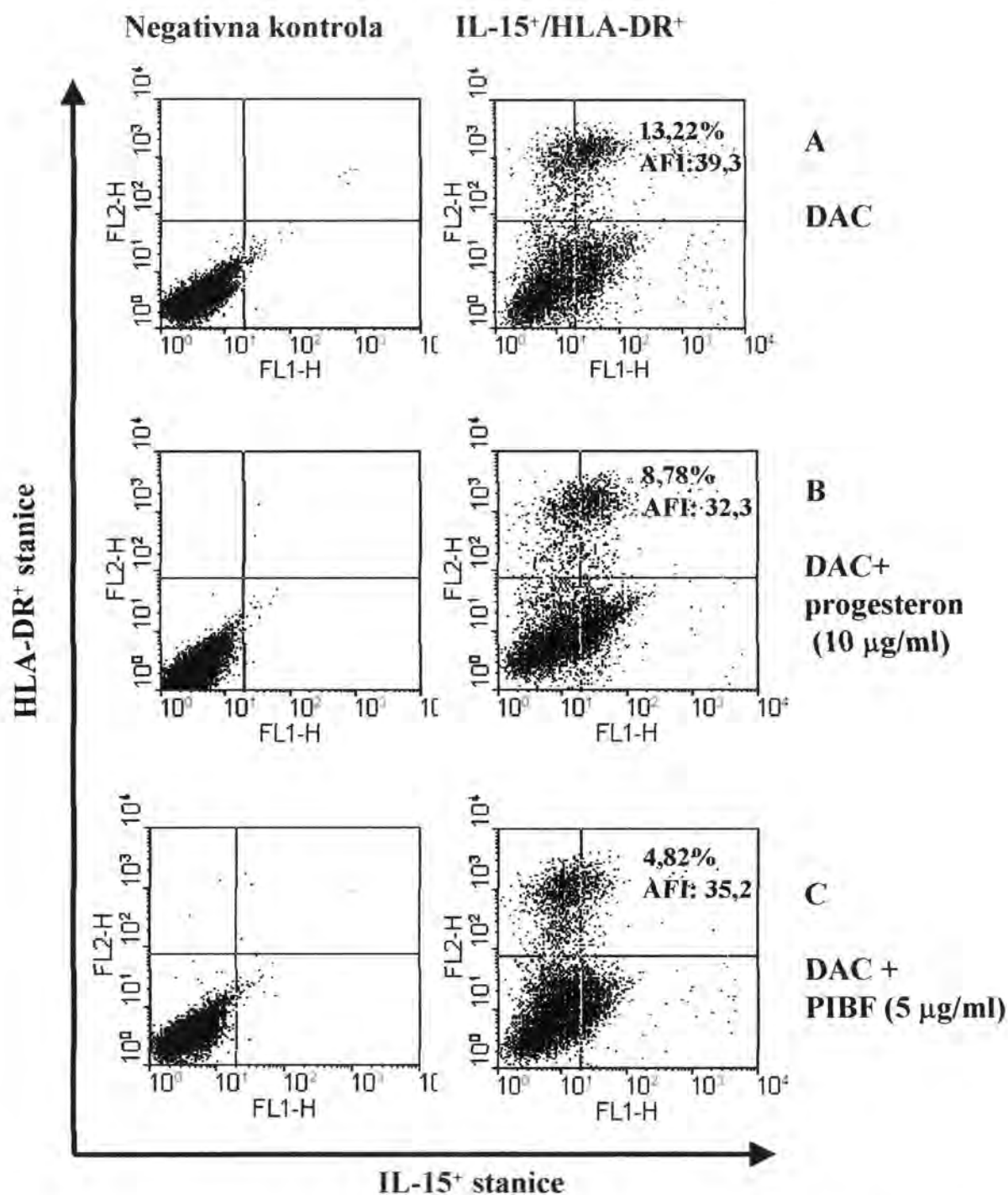
**B) AFI<sup>#</sup> vrijednost za IL-15 u HLA-DR<sup>+</sup> stanicama**

AFI za IL-15 u HLA-DR <sup>+</sup> stanicama		
DAC	DAC + progesteron (10 µg/ml)	DAC +PIBF (5 µg/ml)
36,17±2,34 <sup>a</sup>	34,13±4,41	32,31±2,42

<sup>a</sup> Srednja vrijednost ±standardna devijacija

<sup>#</sup> Average Fluorescence Intensity

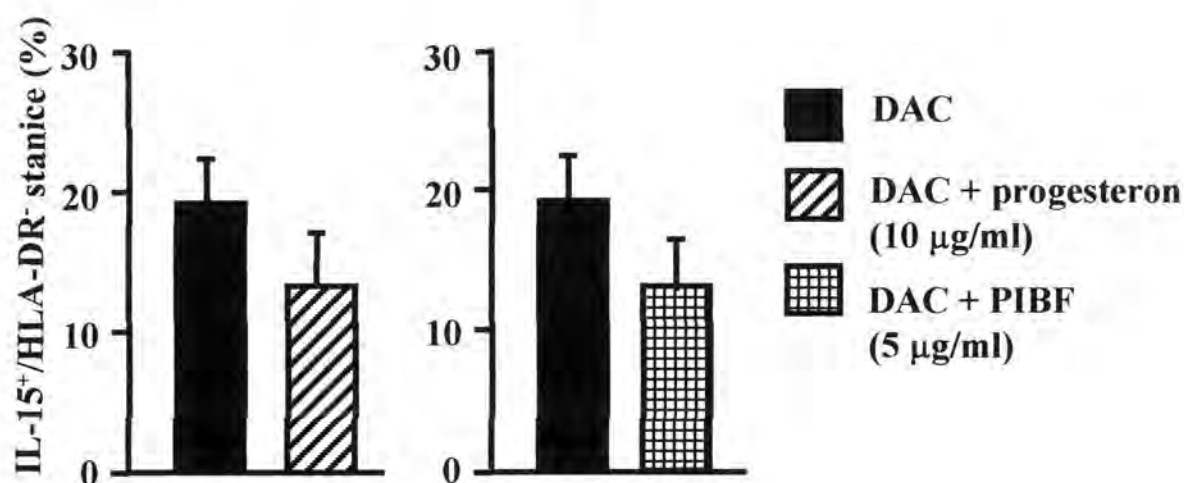
**Slika 4.28. Progesteronom induciran blokirajući faktor (PIBF) smanjuje udio IL-15<sup>+</sup> stanica i prosječan broj IL-15 molekula po pojedinoj HLA-DR<sup>+</sup> stanici iz suspenzije decidualnih adherentnih stanica (DAC).**



AFI eng. Average Fluorescence Intensity

*Slika 4.29. Progesteron i progesteronom induciran blokirajući faktor (PIBF) ne utječu na izražavanje IL-15 u decidualnim adherentnim HLA-DR negativnim stanicama*

**A) Postotak IL-15<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> decidualnih adherentnih stanica**



**B) AFI # vrijednost za IL-15 u HLA-DR<sup>-</sup> stanicama**

AFI za IL-15 u HLA-DR <sup>-</sup> stanicama		
DAC	DAC + progesteron (10 µg/ml)	DAC +PIBF (5 µg/ml)
28,62±8,19 <sup>a</sup>	33,65±7,5	30,8±4,01

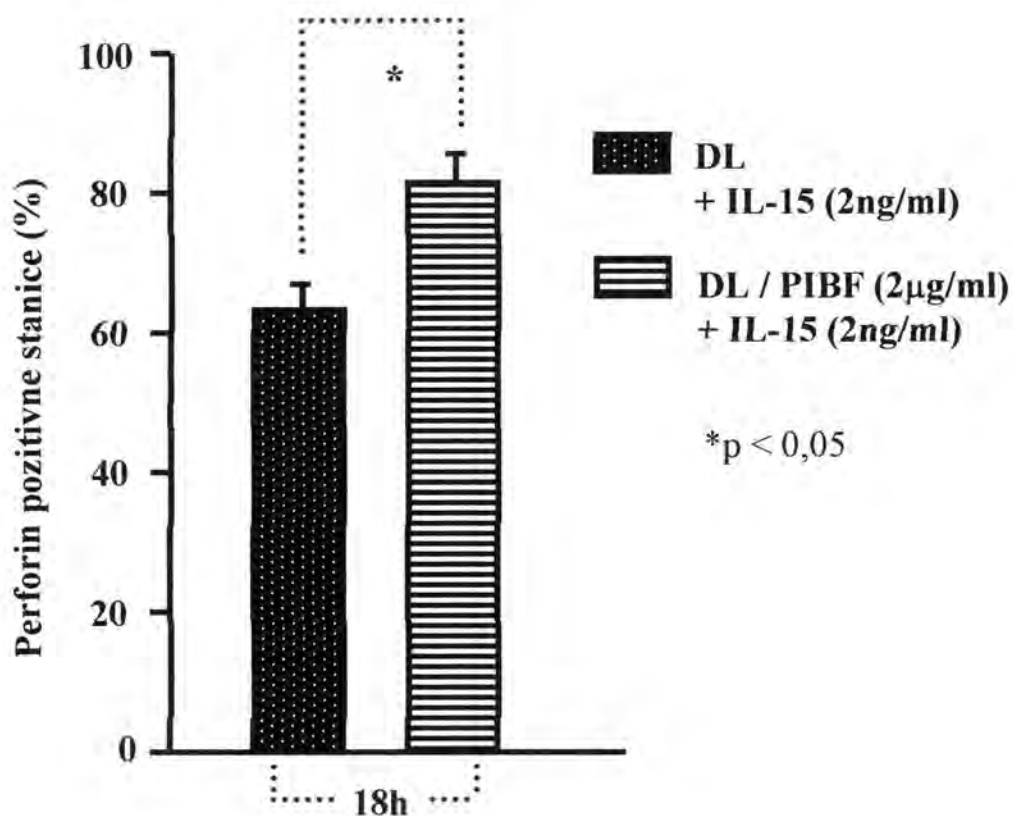
<sup>a</sup> Srednja vrijednost ± standardna devijacija

<sup>#</sup> Average Fluorescence Intensity

#### 4.8. Utjecaj progesteronom induciranog blokirajućeg faktora (PIBF) na izražavanje perforina u decidualnim limfocitima stimuliranim interleukinom-15

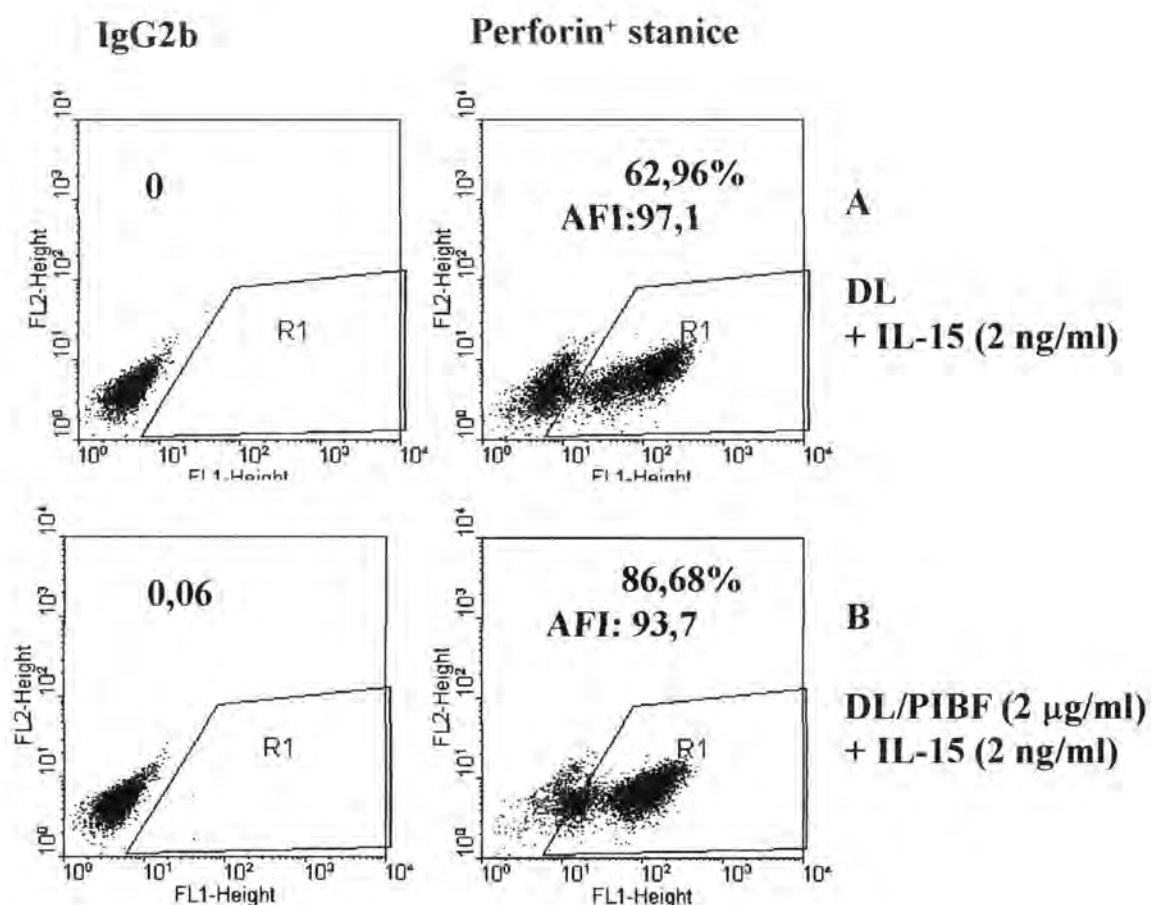
Prethodno je opisano da IL-15 tijekom osamnaestsatne kulture sprječava pad citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita kultiviranih u prisustvu progesterona ili PIBF prema K-562 stanicama, ali ne može povećati citolitičku aktivnost nestimuliranih decidualnih limfocita tijekom 18 sati. Kako je citolitička aktivnost decidualnih limfocita prema K-562 stanicama posredovana perforinom istraživali smo učinak IL-15 na ispoljavanje citolitičkog medijatora perforina u decidualnim limfocitima prethodno stimuliranim s PIBF (n=9-11). Decidualni limfociti izdvojeni iz suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica nakon 18 sati inkubacije *in vitro* samo u mediju stimulirali smo s 2 ng/ml IL-15 tijekom daljnjih 18 sati. Indirektnom imunofluorescencijom utvrdili smo da stanična suspenzija stimulirana na ovakav način sadrži oko 60% perforin pozitivnih stanica. Međutim decidualni limfociti izdvojeni iz suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati u prisustvu 2  $\mu$ g/ml PIBF i dodatno stimulirani s 2 ng/ml IL-15 tijekom 18 sati sadrže oko 80% perforin pozitivnih stanica (Slika 4.30). To predstavlja statistički značajan porast udjela perforin pozitivnih stanica u suspenziji decidualnih limfocita stimuliranih s PIBF ( $p < 0,05$ ) u odnosu na decidualne limfocite nestimulirane PIBF. Na točkastom grafu protočnog citometra jasno se uočava izdvajanje intermedijarnih perforin pozitivnih stanica u vidu oblaka iz perforin negativne subpopulacije decidualnih limfocita prethodno stimuliranih s PIBF pod djelovanjem IL-15 (Slika 4.31B). U prikazanom uzorku decidualnih limfocita broj perforin pozitivnih stanica iznosi 86,68% (Slika 4.31B). Takvo izdvajanje intermedijarnih perforin pozitivnih stanica nismo uočili u kontrolnom uzorku decidualnih limfocita koji nisu prethodno stimulirani PIBF, iako se anti-perforinskim antitijelima obilježava 62,96% stanica (Slika 4.31A). Ovi rezultati ukazuju da PIBF tretirani decidualni limfociti učinkovitije ispoljavaju perforin u odgovoru na stimulaciju s IL-15, te su nas potakli na daljnja istraživanja mogućeg utjecaja PIBF na ispoljavanje receptora za IL-15 na decidualnim limfocitima. Međutim, nismo utvrdili statistički značajnu razliku u postotku decidualnih limfocita koji ispoljavaju  $\beta$  podjedinicu receptora za IL-15 u PIBF stimuliranim i nestimuliranim decidualnim limfocitima (n=4), što prikazuje Slika 4.32. Držimo da bi mnogo interesantnije bilo promatrati ispoljavanje specifične  $\alpha$  podjedinice receptora za IL-15, ali ta nam istraživanja tek slijede.

*Slika 4.30.* Decidualni limfociti (DL) tretirani progesteronom induciranim blokirajućim faktorom (PIBF) statistički značajno više povećavaju udio perforin pozitivnih stanica u odgovoru na stimulaciju s IL-15 nego DL kultivirani samo u mediju



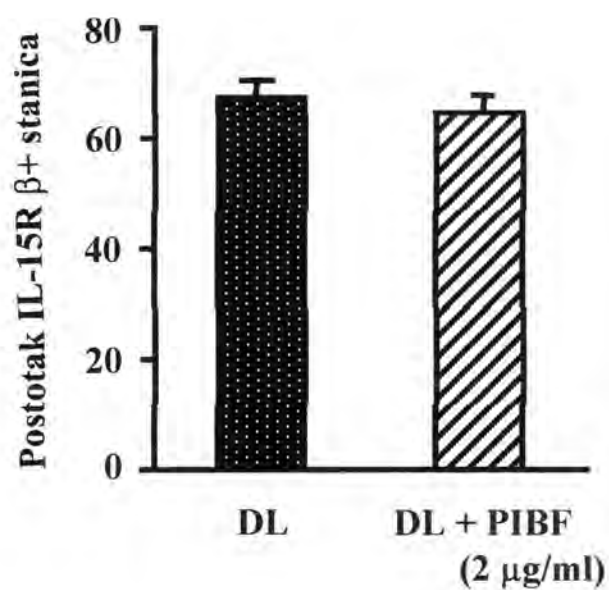
DL i DL/PIBF su izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati u mediju ili u prisustvu PIBF i stimulirani daljnjih 18 sati s IL-15

**Slika 4.31. Učinak IL-15 na izražavanje perforina u nestimuliranim ili PIBF stimuliranim decidualnim limfocitima (DL). Primjer analize postotka perforin<sup>+</sup> DL protočnim citometrom.**



DL i DL/PIBF su izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati samo u mediju ili u prisustvu PIBF i stimulirani daljnjih 18 sati s IL-15.

*Slika 4.32. Progesteronom inducirani blokirajući faktor (PIBF) ne mijenja izražavanje IL-15R $\beta$  lanca na decidualnim limfocitima (DL)*



DL su izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati samo u mediju ili u prisustvu PIBF.

## 5. RASPRAVA



Uspješna trudnoća je rezultat vrlo složenih odnosa između stanica majčina i fetalnog porijekla koje dolaze u izravan dodir u fetoplacentnoj jedinici, te niza tvari lučenih lokalno u visokim koncentracijama (2,69,357). U početnom stadiju razvoja ploda (za vrijeme implantacije), trofoblast čini osnovu fetalnog dijela posteljice i prvi dolazi u izravan dodir sa stanicama majčinog porijekla koje izgrađuju decidualiziranu sluznicu maternice (8). Tada stanice trofoblasta predstavljaju jedinstvenu staničnu populaciju, koja ispoljava na svojim membranama antigene očeva porijekla, koji su bar djelomice nepoznati majci. Usprkos tome trofoblast tijekom zdrave trudnoće ne pokreće reakciju odbacivanja ploda (1,358). Štoviše, alogenski specifične stanice trofoblasta se pod okriljem decidue diferenciraju u dva osnovna sloja: vanjski sloj međusobno stopljenih staničnih citoplazmi s mnogo jezgara (sinciciotrofoblast) i unutrašnji sloj međusobno odijeljenih stanica (citotrofoblast) (8). Tako posteljica ili placenta (grč. *plakou*-pljosnati kolač) predstavlja jedinstven organ sjedinjen od tkiva dvaju različitih jedinki, majke (bazalna decidua) i ploda (amnion i resičasti horion) u jedinstvenu funkcijsku cjelinu.

S imunološke točke gledišta odnosi između imunološki imunokompetentne majke i imunološki nezrelog ploda su puno složeniji nego odnosi u klasičnoj reakciji odbacivanja. Majka može imunološki prepoznati i odbaciti plod u slučaju potrebe tj. infekcije, maligne alteracije ili nakaznosti, imunokompetentnim stanicama decidue (4). Naime, jedno od osnovnih svojstava decidualnog tkiva je bogata infiltracija CD45<sup>+</sup> stanicama (leukocitima) porijeklom iz koštane srži (41). One čine 10-15% ukupnih decidualnih stanica što je procijenjeno metodom imunohistologije u decidui prvog trimestra humane trudnoće, a tvore nakupine oko žlijezda (73%), spiralnih arterija (17%) ili su slobodno razasute u stromi (10%) (20). Također se velik udio CD45<sup>+</sup> leukocita (67%±16%) utvrdio protočnim citometrom u suspenziji stanica dobivenih enzimatskom razgradnjom decidualnog tkiva i centrifugiranjem na gradijentu gustoće (48), što je u skladu sa našim ranijim rezultatima (13). Daljnja analiza decidualnih mononuklearnih stanica dobivenih odvajanjem na gradijentu gustoće utvrdila je da se decidualne stanice mogu podijeliti na temelju njihovih fizičkih svojstava prianjanja na staklo ili plastiku na adherentnu i neadherentnu frakciju (13). Neadherentnu frakciju sačinjavaju limfociti i to: 70-80% veliki zrnati limfociti-decidualne NK stanice, a tek 10-20% decidualni limfociti T (13,44). Decidualne NK stanice bile su za nas od posebnog interesa u ovom istraživanju. To su stanice koje pripadaju NK staničnoj

liniji, ali izražavaju svojstven fenotip i funkcije (38,40,44,48,51). Gotovo sve decidualne NK stanice izražavaju CD56 molekulu na svojoj membrani u 5 puta većoj količini, nego CD56<sup>bright</sup> NK stanice periferne krvi, koje inače čine svega 10% NK populacije periferne krvi (44,359). CD56 molekula je član porodice NCAM molekula (od eng. Neural Cell Adhesion Molecule) i smatra se da pomaže NK stanici iz periferne krvi prijeći u sluznicu maternice, što potvrđuje nalaz izduženih NK stanica elektronskim mikroskopom (20). S druge strane, 7%-23% svježe izoliranih decidualnih NK stanica izražava biljeg Ki67 svojstven stanicama u proliferaciji, a 6%-22% decidualnih NK stanica je u fazama S+G(2)+M (50). Oba rezultata ukazuju da decidualne stanice nastaju i umnožavanjem *in situ*. Tako decidua vjerojatno predstavlja dodatno mjesto umnožavanja NK stanica, međutim ne i njihova potpunog sazrijevanja. IL-15, obilno zastupljen u decidualniom tkivu s početka trudnoće, dodan *in vitro*, ushodno regulira izražavanje CD56 molekule na svježe izdvojenim decidualnim NK stanicama (55). Daljnja se diferencijacija decidualnih NK stanica ne događa u zdravoj trudnoći. Tako su decidualne NK stanice CD57 negativne i izražavaju CD16 molekulu samo iznimno (2%) (13).

Deciduane NK stanice pokazuju fenotip aktiviranih stanica, jer u citoplazmi sadrže brojna zrnca ispunjena citolitičkim medijatorom, koji se rano javlja tijekom sazrijevanja stanica citotoksičnog fenotipa, perforinom i serinskim esterazama (116). Tako decidualne NK stanice čine 90% perforin pozitivnih decidualnih limfocita (13,360). Usprkos tome *in vivo* i *in vitro* svježe izdvojene decidualne NK stanice i limfociti T ne ubijaju stanice trofoblasta u neposrednom dodiru (32,54). To je bar djelomično rezultat interakcije funkcijskih molekula za inhibiciju lize na izvršnim NK stanicama i odgovarajućih MHC antigena razreda I izraženih na trofoblastu (14,15,51). Međutim, u pokusima *in vitro* decidualne NK stanice pokazuju citotoksičnost prema NK osjetljivim ciljevima, kao što su K-562 stanična linija eritroleukemije (60), što dokazuje da inhibicija citotoksičnosti nije posljedica nezrelosti decidualnih stanica. Interesantno, aktivnost decidualnih CD56<sup>+</sup> stanica neposredno nakon izdvajanja je bitno niža (36,6 %) od NK aktivnosti periferne krvi (50,4 %) prema K-562 stanicama, što se kultiviranjem preko noći *in vitro* izjednačava (60). Naši rezultati slično pokazuju da svježe izdvojene decidualne mononuklearne stanice imaju nisku spontanu citolitičku aktivnost prema K-562 stanicama, koja iznosi od 5-15% u rasponu omjera izvršnih i ciljnih stanica od 6:1 do 50:1 (Slika 4.1). Decidualne mononuklearne stanice kultivirane tijekom 18 sati *in vitro* pokazuju statistički značajno veću citolitičku aktivnost prema

istim ciljevima (razina značajnosti  $p < 0,05$  u omjerima izvršnih i ciljnih stanica 50:1 i 25:1) (Slika 4.1). Decidualne mononuklearne stanice, koje su u ovim pokusima postavljane u odnose s ciljnim K-562 stanicama sadržavale su neadherentne decidualne limfocite i adherentne stanice. Adherentne stanice predstavljaju više staničnih populacija u kojima dominiraju stromalne stanice (80%), a ostatak čine makrofagi (10-15%), te stanice žljezdanog epitela, endotela i trofoblasta (5%) (356). K-562 stanična linija eritroleukemije je NK osjetljiva stanična linija, te se može ubiti jedino NK stanicama i to 98% perforinskim putem (61). Prisutnost drugih staničnih populacija, osim decidualnih NK stanica, u smjesi izvršnih stanica u našim pokusima može utjecati na realan omjer izvršnih i ciljnih stanica, te regulirati citolitički potencijal i aktivnost izvršnih decidualnih NK stanica, ali ne i direktno ubiti ciljne stanice. Niska citolitička aktivnost svježe izdvojenih decidualnih mononuklearnih stanica mogla bi biti posljedica izlaganja decidualnog tkiva tripsinu tijekom izdvajanja decidualnih limfocita, koji je mogao oštetiti membranske bjelančevine, između kojih i aktivacijske NK receptore. Na to upućuje smanjena citotoksičnost NK stanica periferne krvi izloženih tripsinu (32). Međutim, niz imunosupresijskih tvari koje se luče u decidui (TGF $\beta$ , IL-4, IL-10, prostaglandin E, progesteron i druge) mogle bi isto tako doprinostiti imunosupresiji svježe izoliranih decidualnih NK stanica koje su još pod utjecajem navedenih tvari. Važan izvor različitih citokina i drugih čimbenika u decidui jesu makrofagi, koji su prisutni i u našim suspenzijama. Pretpostavili smo da bi imunosupresija posredovana svježe izoliranim makrofagima, ali i drugim stanicama mogla utjecati na citotoksičnost decidualnih NK stanica. Da bi pobliže utvrdili mogući učinak decidualnih adherentnih stanica na citotoksičnost decidualnih limfocita odvojili smo adherentne stanice od decidualnih limfocita kratkotrajnim kultiviranjem (dva sata), tijekom kojeg su adherentne stanice prionule za dno Petrijeve zdjelice. Limfocite, koje većinom sačinjavaju decidualne CD3<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD56<sup>bright+</sup> NK stanice, pažljivo smo pokupili pipetom i postavili kao izvršne stanice u odnos sa ciljnim K-562 stanicama. Neposredna citolitička aktivnost decidualnih limfocita po izdvajanju od decidualnih adherentnih stanica nakon dvosatne adherencije iznosila je oko 35% u omjeru izvršnih i ciljnih stanica 50:1 (Slika 4.2), što dobro korelira s nalazom Manaseki i suradnika (60) da *in vitro* pročišćene decidualne CD56<sup>+</sup> NK stanice rane gestacijske dobi nakon kratke inkubacije liziraju 31,2% NK osjetljivu K-562 staničnu liniju. Citolitička aktivnost decidualnih limfocita nakon daljnjih 18 sati kulture *in vitro* u mediju za kulturu tkiva

statistički je značajno niža ( $p < 0,05$  za omjere izvršnih i ciljnih stanica 50:1 i 25:1) u odnosu na neposrednu citolitičku aktivnost decidualnih limfocita odmah po izdvajanju od decidualnih adherentnih stanica. Mogući razlog za to je nedostatak izravnog dodira s adherentnim stanicama ili citokina koje luče adherentne stanice. Naime, aktivirani makrofagi *in vitro* bi mogli lučiti čimbenike koji potiču citolitičku aktivnost decidualnih NK stanica, kao npr. IL-2, IL-12, IL-15 i IFN $\gamma$ . Nedostatak decidualnih adherentnih stanica (posebice makrofaga) i njihovih citokina u kulturama decidualnih limfocita kultiviranih samo u mediju tijekom 16 sati moglo bi biti odgovorno za nishodno reguliranje citotoksičnosti. Snižena citolitička aktivnost decidualnih limfocita kultiviranih na takav način, ide u prilog našim prijašnjim rezultatima, koji pokazuju da se udio perforin pozitivnih stanica spontano smanjuje u suspenziji decidualnih limfocita kultiviranih 18 sati samo u mediju (356). Međutim, u suspenziji decidualnih limfocita kultiviranih u prisustvu 30% decidualnih adherentnih stanica sadržaj perforina se statistički značajno povećava tijekom 18 sati kultiviranja *in vitro* (356). Deplecija HLA-DR<sup>+</sup> stanica, vjerojatno makrofaga, iz suspenzije decidualnih adherentnih stanica uklonila je sposobnost održavanja perforina u decidualnim limfocitima tijekom 18 sati kultiviranja (356). Drugim riječima, decidualni makrofagi su bitni za održavanje perforina u suspenziji decidualnih limfocita. Pretpostavili smo da makrofagi topljivim čimbenicima reguliraju citolitičku aktivnost decidualnih limfocita i analizirali smo citotoksičnost decidualnih limfocita izdvojenih nakon dvosatne adherencije od decidualnih adherentnih stanica, te citotoksičnost tako izdvojenih decidualnih limfocita i kultiviranih daljnjih 16 sati samo u mediju ili u supernatantu decidualnih adherentnih stanica. Supernatant decidualnih adherentnih stanica snižavao je citolitičku aktivnost decidualnih limfocita tijekom 16 satne kulture *in vitro* u odnosu na citotoksičnost decidualnih limfocita izdvojenih nakon 2 sata adherencije od decidualnih adherentnih stanica ( $p < 0,05$  u svim ispitivanim omjerima) (Slika 4.2). Decidualni limfociti kultivirani 16 sati u supernatantu decidualnih adherentnih stanica također su pokazali nižu citolitičku aktivnost od decidualnih limfocita kultiviranih samo u mediju, iako razlika nije bila statistički značajna. Međutim, rezultat ukazuje da decidualne adherentne stanice imaju ulogu u regulaciji citolitičke aktivnosti decidualnih NK stanica. To je potkrijepljeno nalazom da decidualni limfociti izdvojeni nakon dvosatne adherencije i kultivirani daljnjih 16 sati u mediju manje liziraju K-562 liniju, nego

decidualni limfociti izdvojeni od adherentnih stanica nakon 18 sati kulture *in vitro* ( $p < 0,05$  u omjerima izvršnih i ciljnih stanica 50:1 i 25:1) (Slika 4.3).

Porast citotoksičnosti decidualnih limfocita nakon kratke inkubacije *in vitro* (18 sati) može biti udruženo s lučenjem citokina Th1 skupine u suspenziji decidualnih mononuklearnih stanica (55,60). Citokini Th1 skupine imaju svojstvo poticanja stanicama posredovane imunosti, te *in vitro* povećavaju citotoksičnost humanih limfocita periferne krvi i decidue (55,318,361,362). *In vivo* je utvrđen povećan odnos Th1/Th2 citokina u posteljicama trudnih mišica nakon resorpcije plodova iz imunoloških razloga (272), kao i infiltracija NK stanicama (363). Kinsky (364) je pokazao da tretiranje trudne mišice s tvari C12U, koja snažno potiče lučenje IFN $\gamma$  povećava resorpciju ploda. Isti se učinak postiže ubrizgavanjem splenocita C12U tretiranig donora u trudnu mišicu. Navedeni učinak može se ukloniti anti-NK antiserumom (364). Saito (272), Daniel (277), Szekeres-Bartho (65), Tangri (355) i drugi autori ukazuju na prevladavanje Th1 citokinskog lučenja u perifernoj krvi i decidui trudnih žena s patološkim tijekom trudnoća udruženih s gubitkom ploda, te ukazuju da bi Th1 citokini mogli biti odgovorni za povećanu citotoksičnost limfocita.

Th1 citokin IL-2 je snažan stimulator citotoksičnosti mononuklearnih stanica periferne krvi i utječe na izražavanje svih triju do sada poznatih medijatora brze citotoksičnosti: perforina, FasL i TRAIL (od eng. TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) (83,93,268). Svježe izdvojene NK stanice periferne krvi slabo ubijaju FasL mehanizmom i to samo u kombinaciji s drugim medijatorima brze citotoksičnosti npr. TRAIL, koji djeluje čak brže od FasL posredovane citotoksičnosti (270). Međutim, IL-2 znatno povećava izražavanje oba navedena medijatora na humanim NK stanicama i oni postaju znatno učinkovitiji u lizi Fas<sup>L</sup> Raji ili Jurkat stanične linije (268). Interleukin-2 ima slabiji učinak na izražavanje perforina u NK stanicama, nego limfocitima T (363). NK stanice periferne krvi, koje konstitutivno izražavaju znatno veću količinu perforina u stanici od limfocita T (263), znatno manje povećavaju izražavanje glasničke RNA za perforin pod stimulacijom IL-2 (240). Razlog tome je puno slabija konstitutivna izraženost  $\alpha$  lanca IL-2 receptora na NK stanicama periferne krvi u odnosu na limfocite T, ali prisutnost  $\beta$  i  $\gamma$  lanca IL-2 receptora na NK stanicama intermedijarnim afinitetom veže IL-2 i posreduje učinke IL-2 (240, 263, 266). Decidua prvog tromjesječja zdrave trudnoće u ljudi i rane trudnoće u glodavaca je tkivo s funkcionalnim nedostatkom IL-2, jer je stvaranje IL-2 vjerojatno smanjeno u okolišu s visokom koncentracijom IL-4, IL-

10 i prostaglandina E (2,39). U lizatu mišje decidue od 8-12 dana trudnoće RT-PCR tehnikom, nije dokazana glasnička RNA za IL-2 (39), ali se pokazalo da davanje IL-2 normalnim trudnim mišicama dovodi do pobačaja (355). Raghupathy i suradnici (355) su pokazali znatno veću razinu izraženosti IL-2 u posteljicama mišica sklonim imunološki posredovanim gubicima ploda u odnosu na posteljice normalne trudnoće. Nadalje, svježe izdvojene decidualne stanice ne izražavaju IL2 $\alpha$  lanac tj. CD25 molekulu (271). Jedan od mehanizama koji nishodno regulira izražavanje CD25 u decidui glodavaca i ljudi jest prostaglandin E2 izlučen uglavnom iz decidualnih makrofaga pod djelovanjem progesterona (2). Decidualne NK stanice već nakon nekoliko sati kultiviranja *in vitro* izražavaju  $\alpha$  lance na svojim membranama (271) i decidualni NK stanični klonovi jesu 100% CD25 pozitivni (272). Tako, *in vitro* pročišćene humane decidualne NK stanice stimulirane 3 dana s 100 i.j./ml IL-2 postaju citotoksične prema stanicama svježe izoliranog ekstraviloznog trofoblasta i koriokarcinomskoj staničnoj liniji JEG-3, koja izražava HLA-G molekulu na način kao normalni ekstravilozni trofoblast, za razliku od nestimuliranih stanica, koje to nisu u mogućnosti (32,55). IL-2 u navedenoj koncentraciji snažno izaziva LAK aktivnost u decidualnih stanica, ali već nakon 24 sata dvostruko manja koncentracija IL-2 od 50 i.j./ml značajno povećava citotoksičnost pročišćenih decidualnih NK stanica prema K-562 staničnoj liniji u odnosu na nestimuliranu kontrolu (60). Mi smo kultivirali decidualne mononuklearne stanice (limfocite i adherentne stanice) tijekom 18 sati u prisutnosti 100 ili 1000 i.j./ml IL-2 i zatim određivali citotoksičnost decidualnih limfocita prema K-562 stanicama. U našim pokusima koncentracija od 100 i.j./ml IL-2 nije značajnije mijenjala citotoksičnost decidualnih limfocita, dok je koncentracija od 1000 i.j./ml IL-2 statistički značajno povećava citolitičku aktivnost decidualnih limfocita ( $p < 0,05$  u omjeru izvršnih i ciljnih stanica 50:1, 25:1 i 12:1) (Slika 4.4). Tako su decidualni limfociti stimulirani s 1000 i.j./ml IL-2 tijekom 18 sati ubijali čak 70% ciljnih NK osjetljivih K-562 stanica u omjeru 50:1 za razliku od nestimuliranih decidualnih limfocita, koji liziraju oko 40% (Slika 4.4). Prisutnost adherentnih stromalnih stanica i makrofaga, te njihovih topljivih čimbenika u našim pokusima može biti odgovorna za postignuti učinak IL-2, tek u koncentracijama od 1000 i.j./ml.

Pored IL-2, IL-12 je još jedan citokin čija je biološka funkcija u decidui zakočena. Ovaj citokin je snažan pokretač stanicama posredovanog imunološkog odgovora i moguće da bi porast koncentracije IL-12 *in vivo* u decidui uzrokovao

odbacivanje ploda. U trudnica s preeklampsijom u 36 tjednu trudnoće utvrđen je u perifernoj krvi porast Th1 limfocita CD4<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> fenopita uz porast koncentracije IL-12 u plazmi u odnosu na zdrave trudnice (272). Stoga je od posebnog interesa da se izražavanje i funkcija IL-12 u decidui strogo kontrolira tijekom zdrave trudnoće. Dominacija IL-4, IL-10 i TGF $\beta$  tijekom trudnoće u perifernoj krvi, a osobito u decidui predstavlja djelotvoran mehanizam za inhibiciju biološke funkcije IL-12 (4,66,130,278,306,355,365). Osim toga IL-12 ostvaruje funkciju ako se istovremeno na receptor za IL-12 vežu obje podjedinice p40 i p35 ovog citokina. U miša istovremeno vezanje p40 homodimera za receptor predstavlja svojevrsan antagonist IL-12, koji onemogućava vezanje heterodimera IL-12 za receptor i njime posredovane biološke učinke (287). U ljudi p40 homodimer ima zanemarivu ulogu uklanjanja učinaka IL-12, iako *in vivo* i *in vitro* može biti prisutan čak u 100 puta većoj koncentraciji od IL-12 heterodimera (286). Međutim, humana p35 podjedinica IL-12, osim za p40, može se vezati za bjelančevinu molekularne težine 25 kD, koja pokazuje 27% homologije s p40 (290). Ta bjelančevina je otkrivena kao produkt limfocita B inficiranih Epstein Barr-ovim virusom i nazvana EB13 (od eng. Epstein Barr Virus Induced Protein 3). Kasnije je utvrđena konstitutivna izraženost EB13 u humanim posteljicama (290). Humani trofoblast luči p35 u velikim količinama, koji se koimunoprecipitira s EB13, te se može naslutiti da p35 i EB13, umjesto p35 i p40, čine heterodimere *in vivo* (291). Spoj p35 i EB13 djeluje poput hematopoetina i ne može se vezati za receptor za IL-12, te je moguće da je jedna od uloga EB13 u sprječavanju nastanka djelotvornog IL-12 u decidui zdravih trudnoća (290). Glasnička RNA za IL-12 utvrđena je u jednakomjerno maloj količini tijekom trudnoće u miša i ne prati dinamiku izražavanja glasničke RNA za perforin (39). Međutim, prisustvo male količine glasničke RNA za IL-12 ukazuje da bi se IL-12 bjelančevina mogla brzo stvoriti u decidui u slučaju infekcije. Hayakawa i suradnici (318) su pokazali da humani limfociti periferne krvi i decidualne mononuklearne stanice stimulirane 48 sati s 10 i.j./ml IL12 postaju citotoksične prema trofoblastu, te koriokarcinomskim staničnim linijama JAR (HLA-G<sup>-</sup>) i JEG-3 (HLA-G<sup>+</sup>) u odnosu na nestimulirane mononuklearne stanice krvi i decidue, koje ne mogu lizirati navedene ciljeve u 4 satnom testu citotoksičnosti mjerenjem na temelju otpuštanja laktoza-dehidrogenaze (LDH) (318). Stvaranje LAK aktivnosti iz limfocita T i osobito NK stanica interleukinom-12 ne začeđuje, jer IL-12 na neposredan način, bez kostimulacijskih signala iz akcesornih stanica, učinkovito potiče ushodnu regulaciju

receptora za IL-12 (315,316). Tako, iako je izražavanje receptora za IL-12 na decidualnim limfocitima nishodno regulirano u Th2 okolišu decidue, oni *in vitro* postaju podložni djelovanju IL-12. Naši rezultati pokazuju da decidualni limfociti izdvojeni iz suspenzija decidualnih mononuklearnih stanica stimuliranih 18 sati *in vitro* s 50 pg/ml IL-12 značajno više liziraju K-562 staničnu liniju u odnosu na nestimuliranu kontrolu ( $p < 0,05$  u svim ispitivanim omjerima) (Slika 4.5). Ovaj brzi citolitički put vjerojatno je ostvaren degranulacijom decidualnih limfocita i izlučivanjem perforina, iako se još ne zna ima li IL-12 bitnijeg učinka na glasničku RNA za perforin u humanim decidualnim limfocitima.

Za razliku od IL-2 i IL-12 kao predstavnika Th1 citokinske skupine, IL-10 je predstavnik Th2 citokinske skupine, i obilno zastupljen u decidui glodavaca i ljudi (74). Iako IL-10 potiče humoralnu imunost, istraživali smo da li ovaj citokin možda snizuje citolitičku aktivnost decidualnih limfocita. Međutim, citolitička aktivnost decidualnih limfocita izdvojenih iz suspenzije mononuklearnih stanica stimuliranih 18 sati *in vitro* s 5 ng/ml IL-10 nije se statistički značajno mijenjala u odnosu na nestimuliranu kontrolu (Slika 4.6).

Pored bogate infiltracije leukocita i dominacije Th2 citokina decidualno tkivo karakterizira velika koncentracija progesterona (2), koji izražava brojna imunomodulacijska svojstva u perifernoj krvi trudnice (63,140,145,146,153,154). Usprkos činjenici da je progesteron hormon o kojem ovisi ishod trudnoće vrlo je malo podataka koji govore o imunološkim učincima progesterona na materno-fetalnom spoju u ljudi. Modulacija sistemskog imunološkog odgovora tijekom trudnoće može se shvatiti kao pokazatelj lokalnih zbivanja. To bar djelomice otvara mogućnost da se istraživanjem limfocita periferne krvi trudnice ili splenocita miša promatraju mehanizmi koji zaštićuju fetus od imunoloških napada majke. Progesteron smanjuje izvršne funkcije NK stanica periferne krvi u glodavaca i ljudi (63,140). Limfociti periferne krvi trudnice ne proliferiraju na alogensku stimulaciju, niti liziraju stanice fetalnog fibroblasta u prisustvu progesterona (156). Fiziološke koncentracije progesterona u serumu tijekom trudnoće (30-160 ng/ml) dostatne su za *in vitro* blokiranje NK aktivnosti u perifernoj krvi zdravih trudnica (2). To dokazuje nalaz niže citotoksičnosti limfocita periferne krvi zdravih trudnica u odnosu na citotoksičnost limfocita periferne krvi trudnica s patološkim tijekom trudnoća iste gestacijske dobi ili žena koje nisu trudne, tretiranih, *in vitro*, različitim koncentracijama progesterona (30-160 ng/ml) (158). Fiziološke koncentracije progesterona bile su učinkovite samo u



limfocitima periferne krvi trudnice, sugerirajući njihovu veću osjetljivost na ovaj hormon (139). Za sniženje citotoksičnosti limfocita periferne krvi žena koje nisu trudne ili žena sa rizičnim trudnoćama bila je *in vitro* potrebna, znatno veća koncentracija progesterona (139). To se dovodi u vezu sa slabijim izražavanjem receptora za progesteron izvan trudnoće ili u rizičnim trudnoćama (160). Naši pokusi pokazuju da decidualni limfociti izolirani iz suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica kultiviranih 18 sati u prisustvu 10 µg/ml progesterona liziraju statistički značajno manje ciljne K-562 stanice (razina značajnosti  $p < 0,05$  u omjerima izvršnih i ciljnih stanica 50:1 i 25:1), nego decidualni limfociti kultivirani samo u mediju (Slika 4.7). Ovaj učinak progesterona bio je ovisan o koncentraciji hormona i uočen je samo u koncentracijama progesterona većim od 5 µg/ml (Slika 4.7), koja se može usporediti s koncentracijom progesterona na majčino-fetalnom spoju, a koja iznosi 3 µg/g decidualnog tkiva, nego s koncentracijom progesterona u perifernoj krvi za vrijeme trudnoće (2). Histogrami na Slici 4.8 ilustriraju učinkovitost progesterona u koncentraciji 10 µg/ml na jednom uzorku u omjeru izvršnih i ciljnih stanica 50:1 i 25:1. Decidualni limfociti tretirani progesteronom u oba omjera pokazuju gotovo dvostruko smanjenje citolitičke aktivnosti (28,7% vs 56,6% u omjeru 50:1 tj. 20,0% vs 42,0% u omjeru 25:1). Kako bismo istražili molekularni mehanizam brze citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita analizirali smo udio perforin pozitivnih stanica u suspenzijama izvršnih stanica na početku i na kraju dvosatnog testa citotoksičnosti u omjeru 50:1 (Slika 4.9A). U obje suspenzije decidualnih limfocita: stimuliranih i nestimuliranih progesteronom udio perforin pozitivnih limfocita iznosio je oko 40% na početku testa citotoksičnosti. Na kraju dvosatnog testa citotoksičnosti taj se udio perforin pozitivnih limfocita statistički značajno smanjio u suspenziji decidualnih limfocita kultiviranih samo u mediju, kada je iznosio oko 20% ( $p < 0,05$ ) (Slika 4.9). Taj podatak ukazuje da decidualni limfociti, *in vitro*, ubijaju ciljne K-562 stanice izbacivanjem citolitičkog medijatora perforina, te se neposredno nakon dvosatnog testa citotoksičnosti smanjuje udio perforin pozitivnih stanica u suspenziji. Molekule perforina izbačene iz izvršnih stanica, u našem slučaju decidualnih limfocita, se udružuju u oktamere i ugrađuju u membrane ciljnih stanica stvarajući pore (79). Perforinske pore služe za prolaz vode i elektrolita iz izvanstanične tekućine u hiperosmolarnu citoplazmu i uzrokuju bubrenje i smrt ciljne stanice nekrozom. Drugi mehanizam ubijanja ciljne stanice pod djelovanjem perforina jest posredovan serinskim

esterazama. Serinske esteraze su pohranjene zajedno s molekulama perforina u zrcima izvršnih stanica i izbacuju se zajedno s perforinom iz stanica (82). U ciljnu stanicu ulaze kroz perforinske pore i imaju svojstvo cijepanja i degradacije stanične DNA, te uvode stanice u smrt apoptozom (81). U progesteronom stimuliranoj suspenziji stanica na kraju testa citotoksičnosti udio perforin pozitivnih stanica se nije statistički značajnije mijenjao (Slika 4.9A). Nepromijenjen udio perforin pozitivnih stanica ukazuje da je u prisutnosti progesterona sprječena degranulacija decidualnih NK stanica u izravnom dodiru s ciljnim K-562 stanicama, te to može biti razlog sniženja citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita u prisutnosti progesterona u našim pokusima. Nadalje smo analizirali srednji intenzitet fluorescencije za perforin ili AFI vrijednosti (od eng. Average Fluorescence Intensity), koja predstavlja prosječan sadržaj molekula perforina po pojedinoj stanici u našim suspenzijama decidualnih limfocita na početku i na kraju testa citotoksičnosti (Slika 4.9B). Na početku testa AFI vrijednost za perforin u progesteronom stimuliranim i nestimuliranim decidualnim limfocitima iznosi  $35,80 \pm 13,80$  odnosno  $29,47 \pm 13,54$ . Na kraju testa citotoksičnosti AFI vrijednost za perforin nije se statistički značajnije mijenjala u suspenziji nestimuliranih tj. progesteronom stimuliranih decidualnih limfocita (Slika 4.9B). Međutim, na kraju dvosatnog testa citotoksičnosti u omjeru izvršnih i ciljnih stanica 50:1 AFI vrijednost za perforin u decidualnim limfocitima stimuliranim s progesteronom je statistički značajno viša ( $p < 0,05$ ) nego AFI vrijednost za perforin u nestimuliranim decidualnim limfocitima. Ta činjenica je potkrijepila našu hipotezu da decidualni limfociti u prisustvu progesterona zadržavaju perforin u stanici kada su u izravnom dodiru s ciljnim K-562 stanicama. Naši pokusi s concanamycinom A ukazivali su također na uključenost perforina kao posrednika u brznoj citolitičkoj aktivnosti decidualnih limfocita. Concanamicin A zakiseljava vezikule u kojima je pohranjen perforin i na taj način koči vezikularni transport do stanične membrane (107), što onemogućava korištenje perforina u lizi ciljnih stanica. Decidualni limfociti inkubirani 2 sata prije testa citotoksičnosti s concanamycinom A značajno su manje ubijali K-562 ciljne stanice u dvosatnom testu citotoksičnosti u usporedbi s decidualnim limfocitima netretiranim concanamycinom A ( $p < 0,05$  u omjeru izvršnih i ciljnih stanica 50:1) (Slika 4.10). Međutim, decidualni limfociti tretirani s concanamycinom A tijekom 2 sata neposredno prije testa citotoksičnosti još uvijek pokazuju citolitičku aktivnost prema K-562 stanicama i liziraju ih oko 25% u omjeru 50:1 (Slika 4.10). Razlog tome može biti

nedovoljno trajanje kultivacije decidualnih limfocita s concanamycinom A *in vitro* i ispiranje concanamicina A neposredno prije postavljanja decidualnih limfocita u dodir s K-562 stanicama ili uključenost nekih topljivih medijatora citotoksičnosti.

Nadalje, spoznaja da progesteron snizuje citolitičku aktivnost decidualnih limfocita nas je u početku zbunjivala, jer nije išla u prilog činjenici da decidualni limfociti ne izražavaju receptor za progesteron, niti u svojoj jezgri, ni u citoplazmi (276). Stoga smo pretpostavili da progesteron djeluje indirektno na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita putem topljivih proizvoda stanica koje su se nalazile u suspenziji decidualnih mononuklearnih stanica dobivenoj centrifugiranjem na gradijentu gustoće. Stromalne stanice su u velikom postotku prisutne u našim suspenzijama decidualnih mononuklearnih stanica (356) koje smo stimulirali progesteronom *in vitro* i izražavaju receptor za progesteron (276). Jedan od mogućih posrednika progesteronskog djelovanja bi mogao biti progesteronom induciran blokirajući faktor (PIBF) (210,212). To je bjelančevina otkrivena u plazmi trudnica (183). PIBF nastaje u perifernoj krvi kao proizvod progesteronom stimuliranih limfocita, koji izražavaju receptor za progesteron, a to je svega oko 15% CD8+ limfocita (158). Međutim, PIBF je utvrđen u citoplazmi oko 70% limfocita periferne krvi, što ukazuje da bi ova bjelančevina mogla utjecati na funkcije većine limfocita periferne krvi trudnice (183). Fitohemaglutinin i osobito aloantigeni snažno potiču ispoljavanje receptora za progesteron *in vitro* (183). Ovaj nalaz je i *in vivo* relevantan. Limfociti ljudi koji su dobili transfuziju krvi također posjeduju receptor za progesteron ( $5,95 \pm 0,8\%$ ), ali u manjem postotku nego osobe s transplantiranom jetrom ili zdrave trudnice (191). Dugotrajna, *in vivo*, aloantigenska stimulacija jači je poticaj za izražavanje receptora za progesteron, nego jednokratna transfuzija krvi. Tako tijekom trudnoće dugotrajna aloantigenska stimulacija može biti odgovorna za pojavljivanje receptora za progesteron (183,193,366). Krv majke i fetusa ne dolaze u izravan dodir, ali na neposrednoj dodirnoj plohi majčinih i fetalnih tkiva stanice koje nose antigene očeva porijekla mogu prijeći u cirkulaciju majke. Stanice ekstraviloznog trofoblasta odvajaju se od proliferacijske osnove citotrofoblasta. Postepeno, najprije u vidu tračaka, a zatim samostalno prodiru u deciduu, često u vidu velikih stanica s dvostrukom jezgrom nazvanih "gigantskim stanicama" (8). Ekstravilozni trofoblast invadira vene i arterije, te ulazi u cirkulaciju majke (198). Tako je u 36. tjednu gestacije utvrđeno 2-8 trofoblastnih stanica na 1000 leukocita periferne krvi majke, koje mogu potaknuti izražavanje receptora za progesteron u limfocitima

perifernu krvu trudnice (199,200). Drži se da je dobro predočavanje fetalnih antigena majčinom imunološkom sustavu na sistemskoj i lokalnoj razini signal za pokretanje progesteronom posredovane imunosupresije (2). Neadekvatna prezentacija antigena ne potiče izražavanje receptora za progesteron i u nedostatku veznog mjesta progesteron ne može potaknuti stvaranje PIBF, koji doprinosi uspjehu trudnoće. U DBA/Jx CBA/2 kombinaciji miševa postoji habitualna resorpcija oko 50% implantata. U decidui DBA/J mišice postoji insuficijencija supresorskih stanica 8,5-10,5 dana tj. prije početka pobačaja (367). Spontani pobačaji u toj kombinaciji su udruženi s NK i T limfocitnom infiltracijom decidue (363). Chaouat i suradnici (368) su uspješno smanjili resorpciju fetusa u DBA/Jx CBA/2 kombinaciji miševa i vratili aktivnost decidualnim supresorskim stanicama, ako su imunizirali ženku splenocitima Balb/c miša prije parenja s DBA/2 mužjakom. Toder i suradnici (369) su isti učinak postigli tretiranjem CBA/J ženki kompletnim Freud-ovim adjuvansom i smatralo se da su makrofagi odgovorni za smanjenje resorpcije na svega 29%. Kako se resorpcija ploda smanjila u ovoj kombinaciji miševa specifičnom i nespecifičnom stimulacijom, pretpostavilo se da je u nedostatku aloantigenske stimulacije antigenima CBA/2 mužjaka DBA/J mišica nedostatno endogeno stvarala PIBF, što je onda dovelo do porasta citotoksičnosti i pobačaja. Ispravnost ove pretpostavke potvrđuje činjenica da ubrizgavanje PIBF u peritonealnu šupljinu trudne mišice smanjuje postotak resorpcije ploda u križanju CBA/J ženke i DBA/2 mužjaka (4,213). S druge strane, neutralizacija endogenog PIBF specifičnim antitijelima povećava citotoksičnost NK stanica iz slezene trudnih mišica (65). U trudnih žena također koncentracija PIBF u serumu korelira s ishodom trudnoće, ali se značajnije ne mijenja s gestacijskom dobi (232). Koncentracija PIBF u serumu trudnica s prijetecim pobačajem ili prijevremenim porodom značajno je niža od koncentracije PIBF u zdravih trudnica (232). U trudnica s prijetecim prijevremenim porodom sniženje koncentracije PIBF u serumu pratio je porast citotoksičnosti limfocita perifernu krv (232). Mi smo istraživali mogući učinak PIBF na citolitičku aktivnost humanih decidualnih limfocita prvog trimestra trudnoće *in vitro*. PIBF, na način ovisan o koncentraciji tijekom 18 sati stimulacije smanjuje citolitičku aktivnost decidualnih limfocita protiv K-562 stanične linije. PIBF u koncentraciji 1 µg/ml neznatno smanjuje citotoksičnost, dok su koncentracije PIBF od 2 i 5 µg/ml gotovo jednako učinkovito i statistički značajno snižavale citotoksičnost decidualnih limfocita (razina značajnosti  $p < 0,05$  u omjerima izvršnih i ciljnih stanica 50:1 i 25:1) u odnosu na nestimuliranu

kontrolu (Slika 4.11). Da bi pobliže odredili udio citolitičkog medijatora perforina u broj citotoksičnosti decidualnih limfocita stimuliranih s PIBF obilježavali smo perforin metodom imunofluorescencije unutar izvršnih stanica (Slika 4.12). Udio perforin pozitivnih stanica na početku testa citotoksičnosti u PIBF stimuliranim i nestimuliranim suspenzijama decidualnih limfocita nisu se značajno razlikovale i iznosile su oko 40% (Slika 4.12A). Kao što smo ranije u tekstu opisali, na kraju dvosatnog testa citotoksičnosti udio perforin pozitivnih stanica statistički se značajno smanjio u suspenziji decidualnih limfocita kultiviranih samo u mediju ( $p < 0,05$ ), ali je ostao nepromjenjen u PIBF stimuliranim limfocitima (Slika 4.12A). Stabilan broj perforin pozitivnih stanica u suspenziji decidualnih limfocita stimuliranih s  $2 \mu\text{g/ml}$  PIBF ukazuje da PIBF sprječava izbacivanje perforina iz stanica u izravnom dodiru s ciljnim K-562 stanicama. To može biti mehanizam kojim PIBF snižava citolitičku aktivnost decidualnih limfocita. Za razliku od udjela perforin pozitivnih stanica na početku testa citotoksičnosti, AFI vrijednost za perforin se razlikovala u PIBF stimuliranoj i nestimuliranoj suspenziji limfocita već na početku testa (Slika 4.12B). Decidualni limfociti kultivirani u prisustvu PIBF imaju statistički značajno veći prosječan broj molekula perforina po pojedinoj stanici ( $73,44\% \pm 35,90$ ) u odnosu na decidualne limfocite iz nestimuliranih suspenzija ( $29,47 \pm 13,54$ ) ( $p < 0,05$ ) (Slika 4.12B). Ovaj rezultat ukazuje da PIBF sprječava gubitak perforina iz decidualnih limfocita koji nastaje uslijed kultiviranja stanica *in vitro* tijekom noći ili da decidualni limfociti u prisutnosti PIBF odgovaraju učinkovitije sintezom perforin proteina na moguće stimulacijske čimbenike spontano izlučene u suspenziji. Na kraju testa citotoksičnosti AFI za perforin u decidualnim limfocitima kultiviranim samo u mediju ili u prisustvu PIBF nije se statistički značajnije mijenjao u odnosu na kontrolne vrijednosti s početka testa citotoksičnosti, iako se uočava gubitak prosječnog broja molekula perforina po pojedinim decidualnim limfocitima kultiviranim samo u mediju i povećanje prosječnog sadržaja perforina po pojedinim limfocitima kultiviranim s PIBF. Na kraju testa citotoksičnosti u omjeru izvršnih i ciljnih stanica 50:1 postoji statistički značajno veći prosječan broj molekula perforina po pojedinom limfocitu stimuliranom s PIBF (AFI za perforin:  $93,79 \pm 31,80$ ) u odnosu na limfocite kultivirane samo u mediju (AFI za perforin:  $22,66 \pm 14,72$ ) ( $p < 0,05$ ) (Slika 4.12B). Ovaj rezultat navodi na zaključak da decidualni limfociti stimulirani s PIBF akumuliraju bjelančevinu perforina u stanici i ne posreduju lizu ciljnih K-562 stanica u izravnom dodiru. Kako prema našim

istraživanjima obje tvari: progesteron i PIBF snižavaju citotoksičnost decidualnih limfocita, analizirali smo spontanu smrtnost izvršnih stanica-decidualnih limfocita. Na taj smo način željeli isključiti mogućnost da je smanjenje citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita, kao izvršnih stanica, posljedica njihove prevelike smrtnosti. Međutim, nisno našli statistički značajnu razliku u viabilnosti limfocita kultiviranih 18 sati u prisustvu progesterona ili PIBF u odnosu na limfocite kultivirane samo u mediju, iako je smrtnost izvršnih stanica bila relativno visoka i iznosila oko 15 % (Slika 4.13).

Nadalje nas je interesiralo da li PIBF posreduje učinke progesterona u regulaciji citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita *in vitro*. Tako smo istraživali učinak blokirajućih anti-PIBF antitijela na smanjenje citolitičke aktivnosti posredovane progesteronom. Na Slici 4.14 se progesteronom posredovano smanjenje citolitičke aktivnosti uklanja anti-PIBF antitijelima. Naime, decidualni limfociti kultivirani u prisutnosti progesterona i anti-PIBF antitijela pokazuju statistički značajno višu citotoksičnost nego decidualni limfociti kultivirani u prisustvu progesterona ( $p < 0,05$  u svim ispitivanim omjerima izvršnih i ciljnih stanica) (Slika 4.14). Štoviše, citolitička aktivnost decidualnih limfocita stimuliranih progesteronom i anti-PIBF antitijelima prema K-562 stanicama je viša od citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita kultiviranih samo u mediju (Slika 4.14). Taj podatak upućuje da su anti-PIBF antitijela blokirala PIBF ne samo stvoren u suspenziji *in vitro* tijekom stimulacije progesteronom, nego i endogeni PIBF u stanicama decidue. To nas je potaklo na istraživanje prisutnosti i raspodjele PIBF u decidualnom tkivu. Imunohistologijskim obilježavanjem anti-PIBF antitijelima decidualnog tkiva uklopljenog u parafin utvrdili smo obilje PIBF pozitivnih stanica (Slika 4.15B) u odnosu na izotipsku kontrolu (Slika 4.15A). PIBF pozitivne stanice bile su u našim preparatima velike, intenzivno smeđe obojene i difuzno razasute po stromi. Svojim izgledom i distribucijom su podsjećale na stromalne stanice. Moguće je da stromalne stanice decidue, koje izražavaju receptor za progesteron (276) proizvode PIBF pod djelovanjem progesterona. S obzirom da su naši pokusi pokazali da PIBF snižuje citolitičku aktivnost decidualnih limfocita, istraživali smo prisutnost PIBF u svježe izoliranim decidualnim mononuklearnim stanicama (Slika 4.16). Dvostrukim imunocitokemijskim obilježavanjem utvrdili smo da su CD56 pozitivni decidualni limfociti (prikazano srebrnocrnom bojom) istovremeno i PIBF pozitivni (prikazano narančastom bojom) (Slika 4.16). Pretpostavili smo da decidualni limfociti internaliziraju PIBF stvoren i izlučen u intersticij od strane stromalnih stanica. Progesteron, putem stromalnih stanica i PIBFa, moguće nadzire aktivnost decidualnih

limfocita, koji ne izražavaju receptor za progesteron. Do danas mehanizam kojim se ostvaruje imunosupresija posredovana progesteronom/PIBFom nije potpuno razjašnjena, iako je Chaouat još 1987.g. (216) smatrao da postoji više posrednika uključenih u ovaj mehanizam. Pokusi *in vivo*, na životinjskom modelu potvrđuju da je učinak PIBF posredovan citokinima (65). Neutralizacijom endogenog PIBF specifičnim antitijelima smanjuje se stvaranje IL-10, a povećava stvaranje IL-12 i TNF $\alpha$  u splenocitima miša, kao i NK aktivnost mišjih splenocita (65). IL-4 i IL-10 smanjuju resorpciju ploda u CBA/JxDBA/2 kombinaciji miševa (4). U ljudi je utvrđeno povećano lučenje snažnog citolitičkog stimulatora IL-12, a smanjeno izražavanje PIBF i IL-10 u limfocitima periferne krvi trudnica s patološkim tijekom trudnoće, za razliku od učestalije izraženosti PIBF i Th2 citokina (IL-3, IL-4 i IL-10) u limfocitima periferne krvi zdravih trudnica (65,236,237). Dominacija Th2 skupine citokina svojstvena je za deciduu prvog trimestra zdrave trudnoće i udružena je s potisnutom aktivnošću izvršnih stanica citotoksičnosti (8,74). Progesteron/PIBF bi mogao biti čimbenik koji podržava Th2 citokinski milje u decidui. Szekeres-Bartho i suradnici (167) spominju TCR  $\gamma^+/\delta^+$  stanice u decidui, koje posjeduju receptor za progesteron i moguće prve luče veće količine IL-4 u decidui, koji dalje potiče lučenje Th2 citokina (237). Tu hipotezu potkrepljuje nalaz da prethodno uspostavljeni Th1 klonovi izvedeni iz limfocita periferne krvi i decidue stimulirani anti-CD3 antitijelima u prisutnosti progesterona luče više IL-4 i IL-5 (235). Izraženost glasničke RNA za IL-4 bila je veća u navedenim klonovima stimuliranim progesteronom u odnosu na nestimulirane klonove (235). Osim toga izraženost glasničke RNA za IL-4 bila je uvijek veća u decidualnim klonovima zdravih trudnica, nego klonovima izvedenim iz decidua nakon spontanih pobačaja (238).

U svjetlu današnjih spoznaja podjela citokinskog lučenja na Th1 i Th2 citokine postepeno zastarijeva (370). Koncentracija pojedinog citokina ovisi o dinamičkoj ravnoteži brojnih stimulatora i inhibitora lučenja, a različiti, pa čak i suprotni učinci pojedinog citokina na određenu funkciju stanice ovise o interakcijama pojedinog citokina s drugim tvarima u tkivu. Tako se pored visokih koncentracija progesterona i Th2 citokina posljednjih godina kao osobina decidue glodavaca navodi i IL-15, jer je utvrđeno obilje glasničke RNA za IL-15 (39). Interleukin-15 je glavni čimbenik rasta, sazrijevanja i diferencijacije za NK stanice glodavaca i ljudi (39,55). Mišje NK1.1<sup>+</sup> stanice koje se razvijaju u odsutnosti funkcionalne koštane srži nemaju sposobnost

liziranja ciljnih stanica, fenotipski se razlikuju od zrelih NK1.1<sup>+</sup> stanica slezene i podsjećaju na nezrele NK 1.1<sup>+</sup> stanice iz novorođenog ili fetalnog miša (243). Kultiviranje nezrelih mišjih NK1.1<sup>+</sup> stanica u prisutnosti IL-15 razvija u njih sposobnost ubijanja NK osjetljivih ciljeva (243). Složena uloga IL-15 postala je istaknutija u sredini s niskom koncentracijom ili funkcionalnim nedostatkom IL-2, kao što je to slučaj s deciduom glodavaca i ljudi (39,322). Kitaya (349) i Okada (350) ukazuju na ushodnu regulaciju IL-15 tijekom sekrecijske faze endometrijskog ciklusa u odnosu na proliferacijsku fazu na razini glasničke RNA, dok Verma (55) govori tek o neznatnim varijacijama tijekom endometrijskog ciklusa. Međutim svi autori se slažu da se u decidui prvog tromjesječja humane trudnoće glasnička RNA za IL-15 ispoljava znatno više u odnosu na endometrij izvan trudnoće. Različite vrste stanica izražavaju IL-15 kao makrofagi, stromalne i epitelne stanice (349). Ti rezultati u skladu su s našim rezultatima imnohistoloških studija smrznutih decidualnih rezova prvog tromjesječja humane trudnoće (Slika 4.17 i Slika 4.18). Mi smo također utvrdili obilje IL-15 pozitivnih stanica, koje su bile rasprostranjene između glatkih mišićnih stanica u stijenci decidualnih krvnih žila (Slika 4.17B.), podsluzničnog miometrija (Slika 4.17C.), žljezdanog epitela (Slika 4.18C.) ili difuzno raspoređene u stromi (Slika 4.18B.). Difuzno raspoređene IL-15 pozitivne stanice u stromi uvijek su se slabo obilježavale u našim preparatima, te smo prisutnost IL-15 pozitivnih stanica u stromi provjerili obilježavanjem istih imunohistologijom decidualnog tkiva uklopljenog u parafin uz prethodno razotkrivanje antigena zagrijavanjem tkiva u mikrovalnoj pećnici (Slika 4.19). U tako pripremljenim rezovima doista smo utvrdili IL-15 pozitivne stanice razasute u stromi (Slika 4.19B) u odnosu na negativnu kontrolu (Slika 4.19A). Barem dio obilno zastupljenih IL-15 pozitivnih stanica iz decidualnog tkiva uspjeli smo izolirati iz decidue našom uobičajenom metodom enzimatske razgradnje i analizirali njihov fenotip protočnom citometrijom (Slika 4.20). Tada smo utvrdili da 35% decidualnih adherentnih stanica sadržava IL-15 u svojim citoplazmama. Od ukupno 35% IL-15 pozitivnih stanica do 15% se istovremeno obilježavalo anti-HLA-DR antitijelima i upućivalo da se vjerojatno radi o decidualnim HLA-DR<sup>+</sup> makrofagima. Preostalih 20% IL-15 pozitivnih stanica bile su HLA-DR<sup>-</sup> stanice i vjerojatno su predstavljale stromalne stanice (Slika 4.20). To pretpostavljamo s obzirom na činjenicu da u sastavu decidualnih adherentnih stanica u našim izolatima nalazimo oko 80% stromalnih stanica, a 10-15% makrofaga (356). Iz ovih rezultata proizlazi da su svi decidualni makrofagi (10-15%) IL-15 pozitivni i vjerojatno predstavljaju glavni izvor



IL-15 u decidui. Ranije smo već uočili da makrofagi, ali ne i stromalne stanice reguliraju izražavanje perforina u decidualnim limfocitima, jer makrofagi kultivirani zajedno s decidualnim limfocitima tijekom 18 sati potpuno uklanjaju spontani gubitak perforina iz limfocita i održavaju nepromjenjen udio perforin pozitivnih stanica u suspenziji (356). Taj učinak makrofaga može se ukloniti anti-IL-15 antitijelima (354), što ukazuje da je IL-15, izlučen iz makrofaga odgovoran za izražavanje perforina u decidualnim limfocitima. Decidualne stromalne stanice, iako IL-15 pozitivne vjerojatno sadrže IL-15 koji je preveden iz kraće izoforme glasničke RNA i sudjeluje u unutarstaničnom prijenosu signala, a ne u međustaničnoj komunikaciji (348). Tu pretpostavku su potvrdili King i suradnici, koji su dokazali ELISA esejom relativno visoke koncentracije IL-15 (40 pg/ml) u supernatantima trodnevnih kultura pročišćenih decidualnih makrofaga, za razliku od relativno siromašne sekrecije IL-15 u kulturama pročišćenih decidualnih stromalnih stanica (55).

Humane NK stanice izražavaju glasničku RNA za  $\alpha$  lanac receptora za IL-15 i prevode je u bjelančevinu (55,330). IL-15 receptorski  $\alpha$  lanac na membrani NK stanica neophodan je za specifično vezanje IL-15 (330), što dokazuju i decidualne NK stanice, koje proliferiraju stimulirane s 5 ng/ml IL-15 (55). Nadalje, IL-15 na način ovisan o koncentraciji povećava citolitičku aktivnost humanih decidualnih limfocita prema K-562 staničnoj liniji (Slika 4.21). Decidualni limfociti, izdvojeni iz suspenzije decidualnih mononuklearnih stanica nakon 72 sata kulture s 2 ili 5 ng/ml IL-15 pojačano liziraju navedene ciljne stanice, ali je povećanje citolitičke aktivnosti postalo statistički značajno tek u koncentraciji IL-15 od 5 ng/ml ( $p < 0,05$  za omjer izvršnih i ciljnih stanica 50:1) (Slika 4.21). Brzi citolitički učinak IL-15 stimuliranih decidualnih limfocita protiv K-562 stanica posredovan je perforinom, jer concanamycin A uspješno blokira lizu navedenih ciljnih stanica. Decidualni limfociti tretirani s concanamycinom A liziraju svega oko 20% K562 stanica u omjeru izvršnih i ciljnih stanica 50:1, što je statistički značajno manje od prosječno 50% liziranih K-562 stanica nestimuliranim decidualnim limfocitima ( $p < 0,05$ ) (Slika 4.22). Prema našim opažanjima, osim o koncentraciji, učinak IL-15 na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita ovisi o trajanju stimulacije. Tako IL-15 u koncentraciji od 5 ng/ml ne može povećati citolitičku aktivnost decidualnih limfocita posredovanu perforinom tijekom 18 sati stimulacije, za razliku od povećanja citolitičke aktivnosti nakon 72 sata stimulacije *in vitro* (Slika 4.21, Slika 4.22 i Slika 4.23). Međutim, decidualni limfociti stimulirani s IL-15 tijekom 72

sata ne premašuju citotoksičnost koju imaju decidualni limfociti kultivirani kratkotrajno (18 sati) samo u mediju (Slika 4.23), što upućuje da suspenzije svježe izdvojenih decidualnih limfocita posjeduju najveći mogući sadržaj perforina i njime posredovanu citotoksičnost. Nadalje, zanimljivo je da IL-15 dodan u kulturu decidualnih mononuklearnih stanica već nakon 18 sati uklanja progesteronom posredovano smanjenje citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita prema NK osjetljivoj staničnoj liniji (Slika 4.24). Kako IL-15 ushodno regulira izražavanje perforina (354) i citotoksičnost decidualnih limfocita pretpostavili smo da je progesteronom i PIBFom posredovano smanjenje citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita protiv K-562 stanica uzrokovano smanjenim stvaranjem IL-15 u našim suspenzijama. Tu pretpostavku potkrijepio je nalaz statistički značajno nižeg udjela IL-15 pozitivnih stanica ( $p < 0,05$ ) u suspenzijama decidualnih adherentnih stanica kultiviranih u prisustvu progesterona ili PIBF u odnosu na decidualne adherentne stanice kultivirane samo u mediju (Slika 4.26). Dvostruko obilježavanje IL-15 i HLA DR molekule je pokazalo da se smanjenje udjela IL-15 pozitivnih stanica u suspenzijama decidualnih adherentnih stanica događa zbog smanjenja ispoljavanja IL-15 u HLA-DR pozitivnim makrofagima, a ne u HLA-DR negativnim stromalnim stanicama (Slika 4.27, Slika 4.28 i Slika 4.29). To bi značilo da progesteron i PIBF značajnije utječu na ispoljavanje IL-15 u decidualnim makrofagima, nego u stromalnim stanicama, iako stromalne stanice izražavaju receptor za progesteron (423) i čine veći dio ukupnih IL-15 pozitivnih adherentnih stanica izoliranih iz decidue (Slika 4.20). Verma i suradnici (55) su slično uočili ELISA esejom. Medij koji sadržava progesteron i prostaglandin E2 značajno smanjuje lučenje IL-15 u trodnevnoj kulturi pročišćenih decidualnih makrofaga. Suprotno tome, medij koji sadržava progesteron i prostaglandin E2 povećava početno neznatno lučenje IL-15 iz pročišćenih decidualnih stromalnih stanica (55). Već smo prethodno naglasili mogućnost da stromalne stanice posjeduju citoplazmatsku formu IL-15 koja vjerojatno sudjeluje u staničnom signaliranju (348).

Iako progesteron i PIBF smanjuju izražavanje IL-15 u decidualnim makrofagima decidualni limfociti pod djelovanjem progesterona mogu odgovoriti na stimulaciju s IL-15 povećanjem citotoksičnosti (Slika 4.24 i Slika 4.25) i povećanjem izražavanja perforina (Slika 4.30 i slika 4.31). Učinkovitije izražavanje perforina u odgovoru na stimulaciju s IL-15 u PIBF tretiranim decidualnim limfocitima (Slika 4.30 i Slika 4.31) mogao je biti razlog njihove veće citotoksičnosti prema K-562 stanicama. Ti rezultati su nas potakli na istraživanje mogućeg utjecaja PIBF na izražavanje

receptora za IL-15 na membrani decidualnih limfocita. Beta i  $\gamma$  podjedinica receptora za IL-15 udružene vežu IL-15 slabijim afinitetom, ali samo  $\beta$  podjedinica je odgovorna za prijenos signala u stanicu (76). Beta i  $\gamma$  podjedinice ulaze i u sastav receptora za IL-2 (76,248), a obilno su izražene na mišjim i humanim decidualnim NK stanicama (39,55). Našim istraživanjem nismo utvrdili statistički značajnu razliku u postotku decidualnih limfocita koji izražavaju  $\beta$  podjedinicu receptora za IL-15 u PIBF stimuliranim i nestimuliranim decidualnim limfocitima, što pokazuje Slika 4.32. Držimo da bi od većeg interesa bilo proučavati utjecaj progesterona i PIBFa na izražavanje specifične  $\alpha$  podjedinice receptora za IL-15 na decidualnim limfocitima. Na taj način bismo mogli dobiti odgovor zašto PIBF stimulirani decidualni limfociti učinkovitije odgovaraju na stimulaciju IL-15, te je to u planu naših budućih istraživanja. Alfa lanci IL-15 i IL-2 pokazuju međusobno visok stupanj podudarnosti (250), ali udruženi s  $\beta$  i  $\gamma$  podjedinicom vežu IL-2 odnosno IL-15 visokom specifičnošću (329), te određuju biološku razliku među učincima IL-2 i IL-15 (200). Za razliku od  $\alpha$  lanca receptora za IL-2,  $\alpha$  lanac receptora za IL-15 je konstitutivno izražen na membranama humanih decidualnih NK stanica (55). Mehanizmi njegove regulacije su još nepoznati, a odgovoran je za ostvarivanje učinaka IL-15 već u malim koncentracijama i ima važnu ulogu u regulaciji lokalnog, decidualnog imunološkog odgovora. Izgleda da mišje decidualne stanice mlađe gestacijske dobi više izražavaju  $\alpha$  podjedinicu receptora za IL-15, jer stvaraju više glasničke RNA za perforin, što upućuje još jednom na ulogu IL-15 u proliferaciji i diferencijaciji nezrelih decidualnih NK stanica i to osobito na sazrijevanje citolitičkih mehanizama (39). Inkubacija decidualnih NK stanica u mediju koji sadržava 5 ng/ml IL-15 tijekom tri dana povećava njihovu citolitičku aktivnost prema NK osjetljivoj staničnoj liniji K-562 jednako učinkovito kao 100 i.j./ml IL-2 (55). Interleukin-15, *in vitro*, također povećava citolitičku aktivnost decidualnih NK stanica prema koriokarcinomskoj liniji JEG-3, iako u manjoj mjeri nego stimulacija s IL-2 (55). Međutim, IL-15 ne može povećati citotoksičnost prema ekstraviloznom trofoblastu i štoviše, potpomaže invaziju stanica koriokarcinomske JEG-3 stanične linije *in vitro* (55). Mehanizmi regulacije izražavanja IL-15 i brojna međudjelovanja IL-15 s drugim tvarima u decidui čini odgovor decidualnih limfocita *in situ* jedinstvenim. Moguće da precizna ravnoteža između progesterona i PIBFa s jedne strane i IL-15 s druge strane predstavlja okosnicu koja podržava sniženu citolitičku aktivnost

perforinom bogatih decidualnih limfocita tijekom prvog tromjesječja zdrave humane trudnoće *in vivo*.

## 6. ZAKLJUČCI

**1. Decidualne adherentne stanice snažno utječu na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita posredovanu perforinom.**

Decidualne adherentne stanice u izravnom dodiru povećavaju brzu citolitičku aktivnost decidualnih limfocita prema K-562 stanicama *in vitro*, ali povećanje citotoksičnosti izostaje u decidualnim limfocitima kultiviranim u supernatantu decidualnih stanica.

**2. Th1 citokini povećavaju perforinom posredovanu citotoksičnost decidualnih limfocita.**

Kratkotrajna stimulacija decidualnih mononuklearnih stanica (18 sati) s Th1 citokinima: IL-2, IL-12 i IL-15 povećava, dok stimulacija s IL-10, Th2 citokinom ne mijenja značajno citolitičku aktivnost decidualnih limfocita prema K-562 stanicama *in vitro*.

**3. Progesteron smanjuje citolitičku aktivnost decidualnih limfocita *in vitro*.**

Hormon progesteron, *in vitro*, smanjuje brzu citolitičku aktivnost decidualnih limfocita prema K-562 ciljnim stanicama na način ovisan o koncentraciji. Molekularni mehanizam djelovanja progesterona temelji se na zadržavanju molekula perforina unutar izvršnih decidualnih limfocita tijekom dodira s ciljnim stanicama, što dokazuje stabilan udio perforin pozitivnih stanica i AFI vrijednost za perforin tijekom testa citotoksičnosti u suspenziji decidualnih limfocita kultiviranih u prisustvu progesterona.

**4. Progesteronom induciran blokirajući faktor (PIBF) je posrednik progesteronskog djelovanja na citolitičku aktivnost decidualnih limfocita *in vitro*.**

PIBF kao specifičan medijator progesteronskog djelovanja, *in vitro*, na način ovisan o koncentraciji snižuje perforinom posredovanu citolitičku aktivnost decidualnih limfocita, a anti-PIBF antitijela uklanjaju progesteronom posredovano smanjenje citotoksičnosti decidualnih limfocita.

**5. Progesteronom induciran blokirajući faktor (PIBF) prisutan je u decidui prvog tromjesečja normalne humane trudnoće i moguće sudjeluje u regulaciji citolitičke aktivnosti decidualnih NK stanica *in vivo*.**

Metodom imunohistologije utvrdili smo brojne PIBF<sup>+</sup> stanice u decidualnom tkivu prvog tromjesečja normalne humane trudnoće i sve svježe izdvojene decidualne CD56<sup>+</sup> stanice sadrže PIBF u citoplazmi.

**6. Progesteron/PIBF *in vitro* utječe na izražavanje IL-15 i njegov učinak na citolitički potencijal decidualnih limfocita.**

U decidui prvog tromjesečja normalne humane trudnoće utvrdili smo obilje IL-15, iako progesteron/PIBF smanjuje izražavanje IL-15 u suspenziji decidualnih adherentnih stanica, osobito makrofaga *in vitro*, što ukazuje da u decidui *in vivo* postoji, pored inhibitora, snažni stimulatori izražavanja IL-15. Međutim progesteron/PIBF ne sprječava odgovor decidualnih limfocita na IL-15, jer decidualni limfociti tretirani s progesteron/PIBFom i stimulirani s IL-15 učinkovitije povećavaju izražavanje perforina i citotoksičnost posredovanu perforinom, nego decidualni limfociti netretirani progesteronom/PIBFom. Stoga bi precizna ravnoteža između progesteron/PIBFa i IL-15 u decidui mogla biti odgovorna za nagomilavanje perforina u decidualnim limfocitima s potisnutom citolitičkom aktivnosti.

## 7. LITERATURA



1. Medawar BP. Some immunological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol* 1953;7:320.
2. Szereres-Bartho J. Immunosuppression by progesterone in pregnancy. Monograph Boca Raton: CRC Press; 1992.
3. Lanman JT, Dinerstein J, Fikrig S. Homograft immunity in pregnancy: lack of harm to the fetus from sensitization of the mother. *Ann NY Acad Sci* 1962;99:706.
4. Chaouat G, Clark DA, Wegmann TG. Genetic aspects of the CBA/J x DBA/2 and B10 x B10. A models of murine pregnancy failure and its prevention by lymphocyte immunization. U: Beard RW, Sharp F, ur. *Early Pregnancy Loss, Mechanisms and Treatment.*, Ashton-under-Lyne: Peacock Press, 1989; str. 123-138.
5. Heape W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. *Proc R Soc London Biol* 1981;48:457.
6. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF i sur. Incidence of early loss in pregnancy. *N Engl J Med* 1988;319:189-94.
7. Denker HW. Proteases of the blastocyst and of the uterus. U: Beier HM, Karlson P, ur. *Proteins and Steroids in Early Pregnancy.* Berlin: Springer-Verlag; 1982; str. 183.
8. Loke YW, King A. *Humman Implantation. Cell Biology and Immunology.* Cambridge: Combridge University Press; 1995.
9. King A, Boocock C, Sharkey AM i sur. Evidence for expression of HLA-C class I mRNA and protein by human first trimesrer trophoblast. *J Immunol* 1996;156:2068-76.
10. Le Bouteiller P, Rodriguez AM, Mallet V, Girr M, Gullaudeux T, Lenfant F. Placental expression of HLA class I genes. *Am J Reprod Immunol* 1996;35:216-26.
11. Mc Master MT, Librach CL, Zhou Y i sur. Human placental expression of HLA-G is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol* 1995;154:3771-8.
12. Rukavina D, Rubeša G, Gudelj L, Podack ER. Human decidual lymphocytes: phenotype, perforin expression and function. *Reg Immunol* 1994;6:320-5.
13. Verma S, King A, Loke YW. Expression of killer cell inhibiting receptors on human uterine naturel killer cells. *Eur J Immunol* 1997;27:979-83.
14. Pende D, Sinai S, Accame L i sur. HLA-G recognition by human natural killer cells. Involvement of CD94 both as inhibitory and as activating receptor complex. *Eur J Immunol* 1997;27:1822-31.
15. Biassoni R, Cantoni C, Pende D i sur. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Reviews* 2001;181:203-14.

16. Janeway CA, Travers P. Immunobiology. The immune system in health and disease. London, San Francisco, New York, Current Biology Ltd. and Garland Publishing Inc., 1996, str. 4:27, 4:39-41.
17. Holter W, Schwartz M, Cerwenka A, Knapp W. The role of CD2 as a regulator of human T-cell cytokine production. *Immunol Reviews* 1996;153:107-22.
18. Falkay G, Torok A, Pacsa AS. The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: Relationship between cytotoxicity and cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1985;9:19-22.
19. Mincheva-Nilsson L, Baranov V, Mo-Wai Yeung M, Hammarstrom S, Hammarstrom M. Immunomorphologic studies of human decidua-associated lymphoid cells in normal early pregnancy. *J Immunol* 1994;152:2020-5.
20. Mincheva-Nilsson L, Hammarstrom S, Hammarstrom M. Human decidual leukocytes from early pregnancy contain high numbers of  $\gamma/\delta$  cells and show elective down-regulation of alloreactivity. *J Immunol* 1992;149:2203-11.
21. Christmas SE, Brew R, Deniz G, Taylor JJ. T-cell receptor heterogeneity of  $\gamma/\delta$  T-cell clones from human female reproductive tissues. *Immunology* 1993;78:436-43.
22. Mincheva-Nilsson L, Nagaeva O, Sundquist KG, Hammarstrom ML, Hammarstrom S, Baranov V. Gamma delta T cells of human early pregnancy decidua: evidence for cytotoxic potency. *Inter Immunol* 2000;12:585-96.
23. Holoshitz J, Vila LM, Keroack BJ, McKinley DR, Bayne NK. Dual antigenic recognition by cloned human  $\gamma/\delta$  T cells. *J Clin Invest* 1992;89:308-14.
24. Waintraub BC, Jackson MR, Hedrick SM.  $\gamma/\delta$  T cells can recognize nonclassical MHC in the absence of conventional antigenic peptides. *J Immunol* 1994;153:3051-8.
25. Heyborne KD, Cranfill RL, Carding SR, Born WK, O'Brien R. Characterization of  $\gamma/\delta$  T lymphocytes at the materno-fetal interface. *J Immunol* 1992;149:2872-8.
26. Johnson PM, Christmas SE, Vince GS. Immunological aspects of implantation and implantation failure. *Hum Reprod* 1999;14:26-36.
27. Mincheva-Nilsson L, Hammarstrom S, Hammarstrom M-L. Human decidua associated lymphocytes produce immunosuppressive factor(s). U: Chaouat G, Mowbroy J, ur. Cellular and Molecular Biology of the Materno-fetal relationship. Paris,London: Collogues INSERM,John Libbey Eurotext; 1991; str. 345-9.

28. Wegman TG. Maternal T cells promote placental growth and prevent spontaneous abortion. *Immunol Lett* 1988;17:297.
29. Lea RG, Flanders KC, Herley CB, Manuel J, Bauwatt D, Clark DA. Release of a postimplantation murine decidual tissue can be correlated with the detection of a subpopulation of cells containing RNA for TGF- $\beta$ 2. *J Immunol* 1992;148:778-87.
30. Wegman TG, Athanassakis I, Guilbert L i sur. The role of M-CSF and GM-CSF in fostering placental growth, foetal growth and foetal survival. *Transplant Proc* 1989;21:566-8.
31. King A, Birkly C, Loke W. Early human decidual cells exhibit NK-activity against the K562 cell line but not first trimester trophoblast. *Cell Immunol* 1989;118:337-44.
32. Ljunggren HG, Karre K. In search of the "missing" self 2: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990;11:237-41.
33. Lanier LL. Natural killer cells: from no receptor to too many. *Immunity* 1997;6:371-8.
34. Moretta L, Ciccone E, Moretta A, Hoglund P, Ohlen C, Karre K. Allorecognition by NK cell: non-self or no self? *Immunol Today* 1992;13:300-4.
35. Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* 1998;187:813-8.
36. Le Bouteiller P, Mallet V. What could lead to selective expression of HLA-G? U: Gupta SK, ur. *Reproductive Immunology*. New Delhi: Narosa Publishing House; 1999; str. 224-32.
37. Whitlaw PF, Croy BA. Granulated lymphocytes of pregnancy. *Placenta* 1996;17:533-43.
38. Ye W, Zheng L-M, Young JD, Liu CC. The involvement of interleukin-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. *J Exp Med* 1996;184:2405-10.
39. Liu CC, Parr EL, Young YD. Granulated limfoid cells of the pregnant uterus: Morphological and functional features. *Int Rev Cytol* 1994;153:105-36.
40. Podack ER, Hengartner H, Lichtenheld MG. A central role of perforin in cytolysis. *Annu Rev Immunol* 1991;9:129-57.

41. Haller H, Radillo O, Rukavina D i sur. An immunohistochemical study of leukocytes in human endometrium, first and third trimester basal decidua. *J Reprod Immunol* 1993;23:41-9.
42. Nakazawa T, Agematsu K, Yabuhara A. Later development of Fas ligand-mediated cytotoxicity as compared with granule-mediated cytotoxicity during the maturation of natural killer cells. *Immunol* 1997;92:180-187.
43. Burnett TG, Hunt JS. Nitric oxide synthase-2 and expression of perforin in uterine NK cells. *J Immunol* 2000;164:5245-50.
44. King A, Loke YW. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunol Today* 1991;12:432-5.
45. King A, Wellings V, Gardner L, Loke YW. Immunohistochemical characterisation of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum. Immunol.* 1989;24:195-205.
46. Igarashi T, Konno R, Okamoto S, Moriya T, Satoh S, Yajima A. Involvement of granule-mediated apoptosis in the cyclic changes of the normal human endometrium. *Tohoku J Exp Med* 2001;193:13-25.
47. Konno R, Igarashi T, Okamoto S i sur. Apoptosis of human endometrium mediated by perforin and granzyme B of NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *Tohoku J Exp Med* 1999;187:149-55.
48. King A, Loke YW, Chaouat G. NK cells and reproduction. *Immunol Today* 1997;18:64-6.
49. King A, Gardner L, Loke YW. Co-stimulation of human decidual natural killer cells by interleukin-2 and stromal cells. *Hum Reprod* 1999;14:656-63.
50. Kammerer U, Marzusch K, Krober S, Ruck P, Handgretinger R, Dietl J. A subset of CD56<sup>+</sup> large granular lymphocytes in first-trimester human decidua are proliferating cells. *Fertility & Sterility* 1999;71:74-9.
51. Gudelj L, Deniz G, Rukavina D, Johnson PM, Christmas SE. Expression of functional molecules by human CD3<sup>+</sup> decidual granular leukocyte clones. *J Immunol* 1996;87:609-15.
52. Schallhammer L, Walcher W, Wintersteiger R, Dohr G, Sedlmayr P. Phenotypic comparison of natural killer cells from peripheral blood and from early pregnancy decidua. *Early Pregnancy Biol Med* 1997;3:15-22.
53. Kodama T, Hara T, Okamoto E, Kusunoki Y, Ohama K. Characteristic changes of

- large granular lymphocytes that strongly express CD56 in endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod* 1998;13:1036-43.
54. Zuckerman FA, Head JR. Possible mechanism of nonrejection of the fetoplacental allograft: trophoblast resistance to lysis by cellular immune effectors. *Transplant Proc* 1987;1:544-6.
  55. Verma S, Hiby SE, Loke YW, King A. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. *Biol Reprod* 2000;62:959-68.
  56. Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Miko E, Polgar B, Palkovics T. The role of gamma/delta T cells in the feto-maternal relationship. *Seminars in Immunology* 2001;13:229-33.
  57. Houchins JP, Lanier LL, Niemi EC, Phillips JH, Ryan JC. Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J Immunol* 1997;158:3603-9.
  58. King A, Hiby SE, Gardner L i sur. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors – A review. *Placenta* 2000;21 (Suppl A):S81-S85.
  59. Duchler M, Offerdinger M i sur. NKG2-C is a receptor on human natural killer cells that recognizes structures on K-562 target cells. *Eur J Immunol* 1995;25:2923-31.
  60. Manaseki S, Searle RF. Natural killer (NK) cell activity of first trimester human decidua. *Cell Immunol* 1989;121:166-73.
  61. Oshimi Y, Oda S, Honda, Nagata S, Miyazaki S. Involvement of Fas ligand and Fas mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J Immunol* 1996;157:2909-15.
  62. Okamura K, Furukawa K, Nakakuki M, Yamada K, Suzuki M. Natural killer cell activity during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1984;149:396-9.
  63. Furukawa K, Itoh K, Okamura K, Kumagai K, Suzuki M. Changes in the NK cell activity during the estrus cycle and pregnancy in mice. *J Reprod Immunol* 1984;6:353-63.
  64. Christmas SE, Bulmer JN, Meager A, Johnson PM. Phenotypic and functional analysis of human CD3<sup>+</sup> decidual leucocyte clones. *J Immunol* 1990;71:82-9.
  65. Szekeres-Bartho J, Faust Zs, Varga P, Szereday L, Kelemen K. The immunological pregnancy protective effect of progesterone is manifested via controlling cytokine production. *Am J Reprod Immunol* 1996;35:348-51.

66. Saito S, Umekage H, Nishikawa K i sur. Interleukin 4 (IL-4) blocks the IL-2- induced increased in natural killer activity and DNA synthesis of decidual CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> bright NK cells by inhibiting expression of the IL-2 receptor alpha, beta and gamma. *Cell Immunol* 1996;170:71-7.
67. Doherty PC. Cell-mediated cytotoxicity. *Cell* 1993;75:607-12.
68. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-8.
69. Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A. Leucocytes in human decidua: investigation of surface markers and function. U: Chaouat G, Mowbroy J, ur. *Cellular and Molecular Biology of the Materno-fetal relationship*. Paris/London: Collogues INSERM/John Libbey Eurotext; 1991, str. 189-96.
70. Searle RF, Wren AM, Matthews CJ. In vivo and in vitro functional studies of the antigen presenting cell capacity of human and murine decidua. U: Chaouat G, Mowbroy J, ur. *Cellular and Molecular Biology of the Materno-fetal relationship*. Paris, London: Collogues INSERM, John Libbey Eurotext, 1991; str. 181-8.
71. Bulmer JN, Morrison L, Smith JE. Expression of class II MHC gene products by macrophages in human uteroplacental tissues. *Immunology* 1988;63:707-14.
72. Athanassakis-Vassiliadis I, Papamatheakis J. Modulation of the class II negative state of the murine placenta leads to fetal abortion. U: Chaouat G, Mowbroy J, ur. *Cellular and Molecular Biology of the Materno-fetal relationship*. Paris, London: Collogues INSERM, John Libbey Eurotext; 1991, str. 69-80.
73. Parhar RS, Yagel S, Lala PY. PGE<sub>2</sub>-mediated immunosuppression by first trimester human decidual cells blocks activation of maternal leukocytes in decidua with potential anti-trophoblast activity. *Cell Immunol* 1989;120:61-74.
74. Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG. Synthesis of the helper 2 type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 1993;151:4562-73.
75. Wegman TG. The role of cytokine cross-talk in preventing abortion. (30<sup>th</sup> Forum on Immunology). *Res Immunol* 1990;141:185.
76. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ i sur. Interleukin (IL) 15 is novel cytokine that activates human natural killer cells via components of IL-2 receptor. *J Exp Med* 1994;180:1395-403.
77. Liu CC, Walsh CM, Young JD. Perforin: structure and function. *Immunol Today* 1995;16:4-25.
78. Lichtenheld MG, Oslen KJ, Lu P sur. Structure and function of human perforin.

- Nature 1988; 335:448-52.
79. Shinkai Y, Takio K, Okamura K. Homology of perforin to the ninth component of complement. *Nature* 1988;334:535-7.
  80. Tschopp J, Schafer S, Masson D, Peitch MP, Heusser C. Phosphorilcholine acts as a  $Ca^{++}$  dependent receptor molecule for lymphocyte perforin. *Nature* 1989;337:272-4.
  81. Duke RC, Persechini PM, Chang S, Liu CC, Cohen JJ, Young JD. Purified perforin induces target cell lysis but not DNA fragmentation. *J Exp Med* 1989;170:1451-7.
  82. Smith MJ, Trapani JA. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today* 1995;16:4-13.
  83. Podack ER, Hengartner H, Lichtenheld MG. A central role of perforin in cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:129-57.
  84. Yagita H, Nakata M, Kawasaki A, Shinkai Y, Okamura K. Role of perforin in lymphocyte mediated cytotoxicity. *Adv Immunol* 1992;51:86-94.
  85. Hameed A, Olsen CJ, Lee M-K, Lichtenheld MG, Podack ER. Cytotoxicity by Ca-permeable transmembrane channels. Pore formation caused extensive DNA degradation and cell lysis. *J Exp Med* 1989;169:765-77.
  86. Kawasaki A, Shinkai Y, Yagita H, Okamura K. Expression of perforin in murine natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Eur J Immunol* 1992;24:412-9.
  87. Koizumi H, Liu CC, Zheng LM et al. Expression of perforin and serine esterase by human  $\gamma/\delta$  T cells. *J Exp Med* 1991;173:499-502.
  88. Lancki DW, Hsieh CS, Fitch FW. Mechanisms of lysis by cytotoxic lymphocyte clones. Lytic activity and gene expression in cloned antigen specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 1991;146:3242-9.
  89. Hameed A, Fox WM, Kurman RJ, Hruban RH, Podack ER. Perforin expression in endometrium during the menstrual cycle. *Int J Gynecol Pathol* 1995;14:143-50.
  90. Rukavina D, Podack ER. Abundant perforin expression at the maternal-fetal interface: guarding the semiallogeneic transplant? *Immunol Today* 2000;21:160-3.
  91. Vince GS, Johnson PM. Leucocyte populations and cytokine regulation in human uteroplacental tissues. *Biochem Soc Transactions* 2000;28:191-5.
  92. Trenn G, Takajama H, Sitkovsky MV. Exocytosis of cytotoxic granules may not be required for target cell lysis by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1987;330:72-4.
  93. Lee RK, Spielman J, Zhao DY, Olsen KJ, Podack ER. Perforin, Fas L and tumor

- necrosis factor are major cytotoxic molecules used by lymphokine activated killer cells. *J Immunol* 1996;157:1919-25.
94. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 1994;370:650-2.
  95. Yang Y, Mercep M, Were CF, Ashwell JD. Fas and activation induced Fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas: inhibition of Fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids. *J Exp Med* 1995;181:1673-82.
  96. Martinez-Lorenzo MJ, Alava MA, Garmen S i sur. Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. *Eur J Immunol* 1998;28:2714-25.
  97. Hofmann K, Bucher P. The card domain – a new apoptotic signaling motif. *Trends in Biochemical Science* 1997;22:155-6.
  98. Yeh WC, Delapompa JL, Mccurrach ME i sur. FADD - essential for embryo development and signaling from some but not all inducers of apoptosis. *Science* 1998;279:1954-8.
  99. Newton K, Harris AW, Bath ML, Smith KGC, Strasser A. A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO Journal* 1998;17:706-18.
  100. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-65.
  101. Goldstain P, Marguet D, Depraetere V. Fas bringing cell death and cytotoxicity: the reaper connection. *Immunol Rev* 1995;146:45-53.
  102. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996;274:782-4.
  103. Jewett A, Bonavida B. MHC-class I antigens regulate both the function and the survival of human peripheral blood NK cells: Role of endogenously secreted TNF-alpha. *Clin Immunol* 2000;96:19-28.
  104. Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992;13:151-3.
  105. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994;76:959-62.
  106. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996;84:299-308.
  107. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M i sur. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol*



1999;163:1906-13.

108. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H i sur. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:32401-10.
109. Bodmer JL, Burns K, Schnaider P i sur. TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas (Apo-1/CD95). *Immunity* 1997;6:79-88.
110. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL i sur. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 1996;274:990-2.
111. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996;271:12687-90.
112. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, i sur. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673-82.
113. Gong B, Almasan A. Genomic organization and transcriptional regulation of human Apo2/TRAIL gene. *Bioch Biophys Res Comm* 2000;278:747-52.
114. Thomas WD, Hersey P. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J Immunol* 1998;161:2195-200.
115. Zheng L, Fisher G, Miller RE i sur. Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. *Nature* 1995;377:348-51.
116. Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: Differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 1998;188:2375-80.
117. Mariani SM, Krammer PH. Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur J Immunol* 1998;28:1492-8.
118. Mariani SM, Krammer PH. Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur J Immunol* 1998;28:1492-8.
119. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM i sur. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997;276:111-3.
120. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS i sur. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO Journal* 1997;16:5386-97.
121. Sedger LM, Shows DM, Blanton RA i sur. IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J*

- Immunol 1999;163:920-6.
122. Sedger LM, Shows DM, Blanton RA i sur. IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J Immunol* 1999;163:920-6.
  123. Pan G, Ni J, Wei YF, Yu GL, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997;277:815-21.
  124. Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak M i sur. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a Novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 1997;186:1165-70.
  125. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM i sur. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997;277:818-21.
  126. Phillips TA, Ni J, Pan G i sur. TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. *J Immunol* 1999;162:6053-9.
  127. Pickard RE. Varicella pneumonia in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1968;100:504.
  128. Vaughan JE, Ramirez H. Coccidiomycosis as a complication of pregnancy. *Calif Med* 1951; 74:121-125.
  129. Gleicher N, Cohen CJ, Deppe G. Familiar malignant melanoma of the female genitalia. *Obstet Gynecol Scand* 1979;41:1-15.
  130. Chaouat G. Placental immunoregulatory factors. *J Reprod Immunol* 1987;10:179-88.
  131. Stites DP, S uteri PK. Steroids as immunosuppressants in pregnancy. *Immunol Rev* 1983;75:117-38.
  132. Adcock EW, Teasdale F, August CS i sur. Human chorionic gonadotropin: its possible role in maternal lymphocyte suppression. *Science* 1973;108:845-9.
  133. Morse JH, Stearns G, Arden J, Agosto MG, Canfield RE. The effects of crude and purified human choriogonadotropin on in vitro stimulated human lymphocyte cultures. *Cell Immunol* 1976;25:178-88.
  134. Butterworth M, McClellan B, Allansmith M. Influence of sex immunoglobulin levels. *Nature* 1967;214:1224-6.
  135. Eidinger G, Garrett TJ. Studies of the regulatory effects of sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. *J Exp Med* 1972;136:1098.
  136. Inman RD. Immunologic sex differences and the female predominance in systemic lupus erythematosus. *Arthr Reum* 1978;21:849-52.
  137. Mathur S, Mathur RS, Goust JM, Williamson HO, Fudenberg HH. Cyclic variations in white cell subpopulations in the human menstrual cycle: correlation with

- progesterone and estradiol. *Clin Immunol Immunopathol* 1979;13:246-53.
138. Barak V, Biran S, Halimi M, Traves A. The effect of estradiol on human myelomonocytic cells II, Mechanism of enhancing activity on colony formation. *J Reprod Immunol* 1986;9:355-63.
  139. Mendelsohn J, Multer MM, Bernheim JM. Inhibition of human leukocyte stimulation by steroid hormones: cytokinetic mechanisms. *Clin Exp Immunol* 1977;27:127-31.
  140. Szekeres-Bartho J, Csernus V, Pejtsik B, Emody L, Pacsa AS. Progesterone as an immunologic blocking factor in pregnancy serum. *J Reprod Immunol* 1981;3:333-9.
  141. Andreis I, Pokrajac N, ur. *Fiziologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 1996, str. 939-42.
  142. Csapo AI. The see-saw theory of parturition. U: *Ciba Foundation Symposium 47* ur. "The fetus and Birth". Amsterdam: Elsevier, 1977; str. 159-65.
  143. Lye S, Porter DG. Demonstration that progesterone "blocks" uterine activity in the ewe in vivo by a direct action on the myometrium. *J Reprod Fertil* 1978;52:87-94.
  144. Beier HM. Hormonal stimulation of protease inhibitor activity in endometrial reaction during early pregnancy. *Acta Endocrinol* 1970;63:141-9.
  145. Hansen PJ, Bazer FW, Segerson EC. Skin graft survival in the uterine lumen of ewes treated with progesterone. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1986;12:48-54.
  146. Mori T, Kobayashi H, Nashimoto H, Suzuki A, Nishimura T. Inhibitory effect of progesterone and 20-alpha hydroxypregn-4-n-3-one on the phytohaemagglutinin induced transformation of human lymphocytes. *Am J Obstet Gynecol* 1977;127:151-7.
  147. Clark DA, Siapsys RM, Croy BA, Koeck J, Rossant J. Local active suppression by suppressor cells in the decidua: a review. *Am J Reprod Immunol* 1984;5:78-83.
  148. Clark DA, Siapsys RM, Croy BA, Rossant J. Immunoregulation of host versus-graft responses in the uterus. *Immunol Today* 1984;5:111-5.
  149. Clark DA, Chaput A, Walker C, Rosenthal KL. Active suppression of the host-versus-graft reaction in pregnant mice. IV Soluble suppressor activity obtained from decidua of allopregnant mice blocks response to IL-2. *J Immunol* 1985;134:1659-64.
  150. Chaouat G, Chaffaux S, Duchet-Suchaux M, Voisin G. Immunoreactive products of mouse placenta. I Immunosuppressive effects of crude and water soluble extracts. *J Reprod Immunol* 1980; 2:127-31.
  151. Chaouat G, Kolb JP. Immunoreactive products of murine placenta. II Afferent suppression of maternal cell-mediated immunity by supernatants from short term

- cultures of murine trophoblast enriched cell suspensions. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 1984;135C:205.
152. Brikley J, Clark DA. Characterization of hormone-dependent suppressor cells in the uterus of mated and pseudopregnant mice. *J Reprod Immunol* 1987;10:201-17.
  153. Pavia C, S uteri PK, Perlman JD, Stites DP. Suppression of murine allogeneic cell interactions by sex hormones. *J Reprod Immunol* 1979;1:33-8.
  154. Van Vlasselaer P, Vandepute M. Effect of sex steroids and trophoblast culture supernatants on the cytotoxic activity in mice. U: Han J, ur. *Pregnancy Proteins in Animals.*, Berlin: Walter de Gruyter; 1986, str. 127-32.
  155. Szekeres-Bartho J, Fabian Gy, Pacsa AS, Pejtsik B. Dialyzable serum factors alter cellular immunity in pregnancy. *Experientia* 1981;37:515-6.
  156. Staples LD, Heap RB. Studies of steroids and proteins in relation to the immunology of pregnancy in the sheep. U: Crighton DB, ur. *Immunological Aspects of Reproduction in Mammals.* London: Butterworths, 1984, str. 195.
  157. Szekeres-Bartho J, Hadnagy J, Pacsa AS. The suppressive effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: unique progesterone sensitivity of pregnancy lymphocytes. *J Reprod Immunol* 1985;7:121-8.
  158. Szekeres-Bartho J, Csernus V, Hadnagy J, Pacsa AS. Immunosuppressive effect of serum progesterone during pregnancy depends on the progesterone binding capacity of the lymphocytes. *J Reprod Immunol* 1983;5:81-8.
  159. Szekeres-Bartho J, Hadnagy J, Csernus V, Balazs L, Magyarlaki T, Pacsa AS. Increased NK activity is responsible for higher cytotoxicity to HEF cells by lymphocytes of women with threatened preterm delivery. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1985;7:22-6.
  160. Szekeres-Bartho J, Varga P, Pacsa AS. Immunological factors contributing to the initiation of labour. *Am J Obstet Gyneacol* 1986;155:108-12.
  161. Glascock RF, Hoekstra WG. Selective accumulation of tritium labelled hexoestrol in the reproductive organs of immature female goats and sheep. *Biochem J* 1959;72:673-67.
  162. Wrange O, Gustafsson JA. Separation of the hormone and DNA binding sites of the hepatic glucocorticoid receptor by means of proteolysis. *J Biol Chem* 1978;253:856-65.

163. Carlstedt-Duke J, Okret S, Wrangé O, Gustafsson JA. Immunological analysis of the glucocorticoid receptor: identification of a third domain separated from the steroid-binding and DNA binding domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:4260-4.
164. Evans RM. The steroid and thyroid receptor superfamily. *Science* 1988;240:889-95
165. Ariga N, Suzuki T, Moriya T i sur. Progesterone receptor A and B isoforms in the human breast and its disorders. *Japanese J Cancer Res* 2001;92:302-308.
166. Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I. Progesterone receptor isoforms: Function and regulation. *Revista de Investigación Clínica* 2000;52:686-691.
167. Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K. The novel isoform of the progesterone receptor cDNA in the human testis and detection of its mRNA in the human uterine endometrium. *Oncology* 2000;59:39-44.
168. Conneely OM, Lydon JP. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* 2000;65:571-577.
169. Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon LP, Conneely OM. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 2000;289:1751-1754.
170. Inoue T, Akahira J, Takeyama J i sur. Spatial and topological distribution of progesterone receptor A and B isoforms during human development. *Molecular Cell Endocrinol* 2001;182:83-89.
171. Jensen EV, DeSombre ER. Mechanism of action of the female sex steroids. *Annu Rev Biochem* 1972;41:203-12.
172. Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW, Desombre ER. A two step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968;59:632-8.
173. Becker PB, Gloss B, Schmid W, Strahle U, Shutz G. In vivo protein-DNA interaction in a glucocorticoid response element require the presence of the hormone. *Nature* 1986;324:686-8.
174. Denis M, Poelinger L, Wikstrom AC, Gustafsson JA. Requirement of hormone for terminal activation of the glucocorticoid receptor to a DNA binding state. *Nature* 1988;333:686-8.
175. Kasid A, Laumas KR. Nuclear progestin receptors in human uterus. *Endocrinology* 1981;109:553-60.
176. Ivarie RD, O'Farrel PH. The glucocorticoid domain: steroid mediated changes in the rate of synthesis of rat hepatoma proteins. *Cell* 1978;13:41-55.

177. Giangrande PH, Kimbrel EA, Edwards DP, McDonnell DP. The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Molecular and Cell Biol* 2000;20:3102-3115.
178. Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V i sur. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates cSrc family tyrosine kinases. *Molecular Cell* 2001;8:269-280.
179. King WJ, Greene GL. Monoclonal antibodies localize estrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 1984;307:745-7.
180. Pertschuk LP, Eisenberg KB, Carter AC, Feldman JG. Immunohistologic localization of estrogen receptors in breast cancer with monoclonal antibodies. *Cancer* 1985;55:1513-8.
181. Press MF, Nousek-Goebel N, King WJ, Herbst AL, Greene GL. Immunohistochemical assessment of estrogen receptor distribution in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Lab Invest* 1984;51:495-503.
182. Szekeres-Bartho J, Csernus V, Hadnagy J. The blocking effect of progesterone on lymphocyte responsiveness is receptor-mediated. *Biol Immunol Reprod* 1989;15:36-43.
183. Szekeres-Bartho J, Szekeres Gy, Debre P, Autran B, Chaouat G. Reactivity of lymphocytes to a progesterone receptor-specific monoclonal antibody. *Cell Immunol* 1990;125:273-83.
184. Clemens LE, Süteri PK, Stites DP. Mechanisms of immunosuppression of progesterone on maternal lymphocyte activation during pregnancy. *J Immunol* 1979;122:1978-85.
185. Logeat F, Pamphile R, Loosfelt H, Jolivet A, Fournier A, Milgrom E. One step immunoaffinity purification of the active progesterone receptor. Further evidence in favour of the existence of a single steroid binding subunit. *Biochemistry* 1985;24:1029-35.
186. Szekeres-Bartho J, Reznikoff-Etievant MF, Varga P, Pichon MF, Varga T, Chaouat G. Lymphocytic progesterone receptors in normal and pathological human pregnancy. *J Reprod Immunol* 1989;16:239-47.
187. Szekeres-Bartho J, Varga P, Kinsky R, Chaouat G. Progesterone-mediated immunosuppression and the maintenance of pregnancy. *Res Immunol* 1990;141:175-81.
188. Svec F. Glucocorticoid receptor regulation. *Life Sci* 1985;36:2359-66.

189. Muldoon TG. Regulation of steroid hormone receptor activity. *Endocr Rev* 1990;1:339-44.
190. Walters MR, Clark JH. Cytosol and nuclear compartmentalization of progesterone receptors of the rat uterus. *Endocrinology* 1978;103:601-9.
191. Szekeres-Bartho J, Weill BJ, Mike G, Houssin D, Chaouat G. Progesterone receptors in lymphocytes of liver transplanted and transfused patients. *Immunol Lett* 1989;22:259-61.
192. Pence H, Petty EM, Rocklin RE. Suppression of maternal responsiveness to paternal antigens by maternal plasma. *J Immunol* 1985;114:525-31.
193. Bell SC, Billington D. Anti-fetal alloantibody in the pregnant female. *Immunol Rev* 1983;75:87.
194. Ellis SA, Sargent IL, Redman CWG, Mcmichael AJ. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology* 1986;59:595-601.
195. Kovacs S, Mainm EK, Librach C, Stubbine M, Fischer SJ, DeMars R. A class I antigen expressed in human trophoblasts. *Science* 1990;248:220-3.
196. Szekeres-Bartho J, Varga P, Pacsa AS. Immunological factors contributing to the initiation of labour. Lymphocyte reactivity in term labour and threatened preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1986;155:108-12.
197. Parham P, Barnstable C, Bodmer WF. Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,B,C antigens. *J Immunol* 1979;123:342-9.
198. Attwood HD, Park WW. Embolism to the lungs by trofoblast. *J Obstet Gyneacol Br Commonw* 1961;68:111-8.
199. Cavone AE, Mutton ED, Johnson PM, Adinolfi M. Trofoblast cells in peripheral blood of pregnant women. *Lancet* 1984;2:841-3.
200. Mueler UW, Hawes CS, Wright AE i sur. Isolation of fetal trophoblast cells from periferal blood of pregnant women. *Lancet* 1990;336:197-200.
201. Kozma R, Spring J, Johnson PM, Adinolfi M. Detection of syncytiotrofoblast in maternal peripheral and uterine veins using monoclonal antibody and flow cytometry. *Reproduction* 1986;1:335-6.
202. Elger W, Beier S, Chwalisz K i sur. Studies on the mechanism of action of progesterone antagonists. *J Steroid Biochem* 1986;12:835-45.
203. Elger W, Beier S, Chwalisz K i sur. Studies on the mechanism of action of progesterone antagonists. *J Steroid Biochem* 1986;12:835-45.

204. Shoupe D, Mishell DR Jr, Brenner PF, Spitz IM. Pregnancy termination with high and medium dosage regimen of RU 486. *Contraception* 1986;33:455-61.
205. Couzinet B, Le Strat N, Ulmann A, Baulieu EE, Schaison G. Termination of early pregnancy by the progesterone antagonist RU 486 (Mifepristine). *N Engl J Med* 1986;315:1565-70.
206. Philibert D, Moguilewsky M, Mary I, Lecaque D, Tournamine C, Secchi J, Deraedt R. Pharmacological profile of RU 486 in animals. Baulieu EE and Segal SJ, ur. *The Antiprogestin Steroid RU 486 and Human fertility Control*. New York: Plenum Press, 1985; str. 49.
207. Szekeres-Bartho J, Szabo J, Kovacs L. Alteration of lymphocyte reactivity in pregnant women treated with the progesterone receptor inhibitor ZK98734. *Am J Reprod Immunol* 1989;21:46-9.
208. Horne CH, Towler CM, Pugh-Humphreys RGP i sur. Pregnancy-specific beta 1 glycoprotein-a product of the syncytiotrophoblast. *Experientia* 1976;32:1197.
209. Grudzinskas S, Gordon YB, Jeffrey D, Chard T. Specific and sensitive determination of pregnancy-specific beta 1-glycoprotein by radioimmunoassay. *New pregnancy test*. *Lancet* 1977;1:333-5.
210. King A, Burrows TD, Hiby SE i sur. Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast. *Placenta* 2000;21:376-87.
211. Szekeres-Bartho J, Philibert D, Chaouat G. Progesterone suppression of pregnancy lymphocytes is not mediated by glucocorticoid effect. *Am J Reprod Immunol* 1990;23:42-3.
212. Szekeres-Bartho J, Autran B, Debre P, Andreu G, Denver L, Chaouat G. Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cell Immunol* 1989;122:281-94.
213. Szekeres-Bartho J, Kinsky R, Chaouat G. The effect of a progesterone-induced immunologic blocking factor on NK-mediated resorption. *Am J Reprod Immunol* 1990;24:105-7.
214. Bonney RJ, Humes JL. Physiological and pharmacological regulation of prostaglandin and leukotriene production by macrophages. *J Leuk Biol* 1984;35:10.
215. Szekeres-Bartho J, Csernus V, Hadnagy J, Pacsa AS. Cytotoxic activity and progesterone binding capacity of maternal lymphocytes are not influenced by gestational age and by the number of previous pregnancies. *Acta Med Acad Sci Hung* 1982;39:137-43.



216. Chaouat G. Placental immunoregulatory factors. *J Reprod Immunol* 1987;10:179-88.
217. Brierley J, Clark DA. Identification of a trophoblast-independent, hormone dependent suppressor cell in the uterus of pregnant and pseudopregnant mice. *J Reprod Immunol* 1987;10:201-9.
218. Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Le Bouteiller P i sur. Progesterone as an immunomodulatory molecule. U: Knjiga sažetaka s "The 6<sup>th</sup> Congress of the Alps-Adria Society of Immunology of Reproduction" Pecs, 2000; 27-30 lipanj str. S5/3.
219. Wilson T, Liggins GC, Aimer GP, Watkins EJ. The effect of progesterone on the release of arachidonic acid from human endometrial cells stimulated with histamine. *Prostaglandins* 1986;31:343-60.
220. Rola-Pleszczinsky M, Gaugnon L, Rudzinska M, Borgeat P, Sirois P. Human natural cytotoxic cell activity; enhancement by leukotriens (LT) A4, B4 and D4, but not by stereoisomers of LTB4 or HETES. *Prostaglandins Leukotrienes Med* 1984;13:113-7.
221. Darrow TL, Tomer RH. Prostaglandin mediated regulation of the mixed lymphocyte culture and generation of cytotoxic cells. *Cell Immunol* 1980;65:172-7.
222. Seaman WE. Human natural killer cell activity is reversibly inhibited by antagonists of lipoxygenation. *J Immunol* 1983;131:2953-60.
223. Carine K, Huding D. Assessment of a role for phospholipase A2 and Arachidonic acid metabolism in human lymphocyte natural cytotoxicity. *Cell Immunol* 1984;87:83.
224. Antonaci S, Jirillo E, Silvestris F, Lucivero G, Fumarola D, Bonomo L. In vitro modulation of cell-mediated immunity by prostaglandin E2. I. Enhancing-inhibitory effects on antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Prostaglandins Leukotriens Med* 1982;9:295-300.
225. Szekeres-Bartho J, Csernus V, Hadgany J, Pacsa AS. Progesterone-prostaglandin balance influences lymphocyte function in regulation to pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1983;4:139-41.
226. Lala PK, Parhar RS, Kearns M, Johnson S, Scodras JM. Immunologic aspects of decidual response. U: Clark DA, Croy BA, ur. *Reproductive immunology*. Amsterdam: Elsevier/North; 1987, str. 190.
227. Goodwin JS, Webb DR. Regulation of the immune response by prostaglandins. *Clin Immunol Immunopathol* 1980;15:106-22.

228. Chaouib S, Welte K, Martelsmann R, Dupont B. Prostaglandin E2 acts at two distinct pathways on T lymphocyte activation: inhibition of interleukin-2 production and down regulation of transferin receptor expression. *J Immunol* 1985;135:1172-9.
229. Falkay G, Sas M. Correlation between the concentrations of prostaglandin dehydrogenase and progesterone in the early human placenta. *J Endocrinol* 1978;76:173-4.
230. Helvacioglu A, Auletta F, Scommegna A. Antifertility effect of Azastene mediated by prostaglandin. *Am J Obstet Gynecol* 1981;141:138-44.
231. Ching CY, Ching N, Seto DSY, Hokama Y. Relationships of prostaglandins levels and natural killer (NK) cell cytotoxicity of mononuclear cells in cord blood. *J Med* 1983;15:233-7.
232. Szekeres-Bartho J, Varga P, Pejtsik B. ELISA test for detection an immunological blocking factor in human pregnancy serum. *J Reprod Immunol* 1989;16:19-29.
233. Szekeres-Bartho J, Wegmann TG, Kelemen K, Bognar I, Faust Zs, Varga P. Interaction of progesterone and cytokine mediated immunomodulatory mechanisms in favor of successful gestation. *Regional Immunol* 1994;6:315-9.
234. Szekeres-Bartho J, Kinski R, Kapovic M, Chaouat G. Complete Freund adjuvant treatment of pregnant females influences resorption rates in CBA/J X DBA/2 matings via progesterone-mediated imunomodulation. *Am J Reprod Immunol* 1991;26:82-3.
235. Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R i sur. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established th1 cell clones. *J Immunol* 1995;155:128-33.
236. Szereday L, Varga P, Szekeres-Bartho J. Cytokine production by lymphocytes in pregnancy. *Am J Reprod Immunolgy* 1997;38:418-22.
237. Szekeres-Bartho J, Wegmann TG. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J Reprod Immunol* 1996;31:81-95.
238. Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nature Medicine* 1998;9:1020-4.
239. Gillis S, Ferm MM, Ou W, Smith KA. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity *J Immunol* 1978;120:2027-32.
240. Nelson BM, Willerford DM. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol* 1998;70:1-81.

241. Kundig TM, Schorle H, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM, Horak I. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science* 1993;262:1059-61.
242. Aste-Amezaga M, D'Andrea A, Kubin M, Trinchieri G. Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells. *Cell Immunol* 1994;156:480-92.
243. Puzanov I, Benett M, Kumar V. IL-15 can substitute for the marrow microenvironment in the differentiation of natural killer cells. *J Immunol* 1996;157:4282-5.
244. Dudley E, Hornung F, Zheng L, Scherer D, Ballard D, Lenardo M. NF-kappaB regulates Fas/APO-1/CD95- and TCR- mediated apoptosis of T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1999;29:878-86.
245. Zheng L, Fisher G, Combadiere B *et al*. Mature T lymphocyte apoptosis in the healthy and diseased immune system. *Adv Exp Med Biol* 1996;406:229-39.
246. Suda T, Okazaki T, Naito Y *et al*. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol* 1995;154:3806-13.
247. Suzuki H, Hayakawa A, Bouchard D, Nakashima I, Mak TW. Normal thymic selection, superantigen-induced deletion and Fas-mediated apoptosis of T cells in IL-2 receptor beta chain-deficient mice. *International Immunology* 1997;9:1367-74.
248. Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M *et al*. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO Journal* 1995;14:3654-63.
249. Nakajima H, Shores EW, Noguchi M, Leonard WJ. The common cytokine receptor gamma chain plays an essential role in regulating lymphoid homeostasis. *J Exp Med* 1997;185:189-95.
250. Di Santo JP. Cytokines: shared receptors, distinct functions. *Curr Biol* 1997;7:424-6.
251. Friedmann MC, Migone TS, Russell SM, Leonard WJ. Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2077-82.
252. Russell SM, Johnston JA, Noguchi MM *et al*. Interaction of IL-2R beta and gamma chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. *Science* 1994;266:1042-5.

253. Fujii H, Nakagawa Y, Schindler U *i sur*. Activation of Stat5 by interleukin 2 requires a carboxyl-terminal region of the interleukin 2 receptor beta chain but is not essential for the proliferative signal transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5482-6.
254. Nelson BH, Lord JD, Greenberg PD. A membrane-proximal region of the interleukin-2 receptor gamma c chain sufficient for Jak kinase activation and induction of proliferation in T cells. *Mol Cell Biol* 1996;16:309-17.
255. Nelson BH, McIntosh BC, Rosencrans LL, Greenberg PD. Requirement for an initial signal from the membrane-proximal region of the interleukin 2 receptor gamma (c) chain for Janus kinase activation leading to T cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1878-83.
256. Brunn GJ, Falls EL, Nilson AE, Abraham RT. Protein-tyrosine kinase-dependent activation of STAT transcription factors in interleukin-2 or interleukin-4-stimulated T lymphocytes. *J Biol Chem* 1995;270:11628-35.
257. Kawahara A, Minami Y, Miyazaki T, Ihle JN, Taniguchi T. Critical role of the interleukin 2 (IL-2) receptor gamma-chain-associated Jak3 in the IL-2-induced c-fos and c-myc, but not bcl-2, gene induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8724-8.
258. Yoshimura A, Ichihara M, Kinjyo I *i sur*. Mouse oncostatin M - an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *EMBO Journal* 1996;15:1055-63.
259. Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K *i sur*. CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 1997;89:3148-54.
260. Karnitz LM, Abraham RT. Cytokine receptor signaling mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1995;7:320-6.
261. Wei S, Gamero AM, Liu JH *i sur*. Control of lytic function by mitogen-activated protein kinase extracellular regulatory kinase 2 (ERK2) in a human natural killer cell line-identification of perforin and granzyme B mobilization by functional ERK2. *J Exp Med* 1998;187:1753-65.
262. Bonnema JD, Rivlin KA, Ting AT, Schoon RA, Abraham RT, Leibson PJ. Cytokine-enhanced NK cell-mediated cytotoxicity. Positive modulatory effects of IL-12 and IL-2 on stimulus dependent granule exocytosis. *J Immunol* 1994;152:2098-104.
263. Clement MV, Haddad P, Soulie A *i sur*. Involvement of granzyme B and perforin gene expression in the lytic potential of human natural killer cells. *Res Immunol* 1990;141:477-89.

264. Rodella L, Rezzani R, Zauli G, Mariani AR, Rizzoli R, Vitale M. Apoptosis induced by NK cells is modulated by the NK-active cytokines IL-2 and IL-12. *Int Immunol* 1998;10:719-25.
265. Smyth MJ, Ortaldo JR, Shinka Y i sur. Interleukin 2 induction of pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T cells. *J Exp Med* 1990;171:1269-81.
266. Mori S, Jewett A, Cavalcanti M i sur. Differential regulation of human NK cell-associated gene expression following activation by IL-2, IFNalpha and PMA/ionomycin. *Int J Oncol* 1998;12:1165-70.
267. Kashii Y, Giorda R, Herberman RB, Whiteside TL, Vujanovic NL. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J Immunopath* 1999;163:5358-66.
268. Johansen AC, Haux J, Steinker B i sur. Regulation of Apo-2 ligand / TRAIL expression in NK cells – Involvement in NK cell- mediated cytotoxicity. *Cytokine* 1999;11:664-72.
269. Lohwasser S, Kubota A, Salcedo M, Lian RH, Takei F. The non-classical MHC class I molecule Qa-1(b) inhibits classical MHC class I restricted cytotoxicity of cytotoxic T lymphocytes. *International immunol* 2001;13:321-27.
270. Caron G, Delneste Y, Aubry JP i sur. Human NK cells constitutively express membrane TNF-alpha (mTNF alpha) and present mTNF alpha-dependent cytotoxic activity. *Eur J Immunol* 1999;29:3588-95.
271. Kurahayasi Y, Ueh S, Okamura K, Yajima A, Sagamura K. Immunological characterisation of human decidual mononuclear cells: natural killer activity, response to interleukin-2 and distribution of interleukin-2 receptor subunits. *Asia Oceania J Obst Gynaecol* 1994;20:101-9.
272. Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Tanebe K, Tsuda H, Michimata T. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clin Exp Immunol* 1999;17:550-3.
273. Chatterjee-Hasrouni S, Perhar R, Lala PK. An evaluation of the maternal natural killer cell population during the course of murine pregnancy. *Cell Immunol* 1984;84:254-75.
274. Gardiner CM, Meara AO, Reen DJ. Differential cytotoxicity of cord blood and bone marrow-derived natural killer cells. *Blood* 1998;91:207-13.

275. Smyth MJ, Cretney E, Takeda K i sur. Tumor necrosis factor – related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med* 2001;193:661-70.
276. King A, Gardner L, LokeYW. Evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in uterine mucosal lymphocytes. *Hum Reprod* 1996;11:1079-82.
277. Daniel Y, Kupferminc MJ, Baram A i sur. Plasma interleukin-12 is elevated in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1998;39:376-80.
278. Raghupathy R, Krishnan L. Immunosuppressive mechanisms in normal pregnancy *Eur J Immunol* 1996;21;133-44.
279. Voss SD, Daley J, Ritz J, Robertson MJ. Participation of the CD94 receptor complex in costimulation of human natural killer cells. *J Immunol* 1998;160:1618-26.
280. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M i sur. Identification and purification of Natural Killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170:827-46.
281. Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M i sur. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol* 1991;146:3074-81.
282. Podlaski FJ, Nanduri VB, Hulmes JD i sur. Molecular characterization of IL-12. *Arch Biochem Biophys* 1992;294:230-7.
283. Bush K, Day NK, Kraus LA, Good RA, Bradley WG. Molecular cloning of feline interleukin 12 p35 reveals the conservation of leucine-zipper motifs present in human and murine IL-12 p35. *Mol Immunol* 1994;35:1373-4.
284. Gearing DP, Cosman D. Homology of the p40 subunit of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) with the extracellular domain of the interleukin-6 receptor. *Cell* 1991;66:9-10.
285. Trinchieri G. Interleukin-12: A cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol* 1998;70:183-243.
286. Ling P, Gately MK, Gubler U i sur. Human IL-p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J Immunol* 1995;154:116-27.
287. Mattner F, Fischer S, Guckes S i sur. The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *Eur J Immunol* 1993;23:2202-8.
288. Heinzl FP, Hujer AM, Ahmed FN, Rerko RM. In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. *J Immunol* 1997;158:4381-8.

289. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of Th1CD4<sup>+</sup>T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993;260:547-9.
290. Devergne O, Hummel M, Koeppen H i sur. A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol* 1996;70:1143-53.
291. Devergne O, Birkenbach M, Kieff E. Epstein-Barr-virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:12041-6.
292. Wu CY, Warriar RR, Carvajal DM i sur. Biological function and distribution of human interleukin-12 receptor beta chain. *Eur J Immunol* 1996;26:345-50.
293. Wu C, Ferrante J, Gately MK, Margram J. Characterization of IL-12 receptor b1 chain (IL-12Rb)-deficient mice. *J Immunol* 1997;159:1658-65.
294. Presky DH, Yang H, Minetti LJ i sur. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptors subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14002-7.
295. Chan SH, Perussia B, Gupta JW i sur. Induction of IFN- $\gamma$  production by NK cell stimulatory factor (NKSF): Characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* 1991;173:869-79.
296. Vogel LA, Showe LC, Lester TL, McNutt RM, Van Cleave VH, Metzger DW. Direct binding of IL-12 to human and murine B lymphocytes. *Int Immunol* 1996;8:1855-962.
297. Germann T, Gately MK, Schoenhaut DS i sur. Interleukin-12 /T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th1) but not on Th2 cells. *Eur J Immunol* 1993;23:1762-70.
298. Yu C, Lin J, Fink DW, Akira S, Bloom ET, Yamauchi A. Differential utilization of Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathways in the stimulation of human natural killer cells by IL-2, IL-12 and IFN $\alpha$ . *J Immunol* 1996;157:126-37.
299. Zou J, Presky DH, Wu CY, Gubler U. Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta 1 and beta 2 and JAK kinases. *J Biol Chem* 1997;272:6073-7.

300. Cho SS, Bacon CM, Sudarsham C i sur. Activation of STAT4 by IL-12 and IFN $\alpha$ : evidence for the involment of ligand-induced tyrosine and serine phosphorylation. *J Immunol* 1996;157:4781-9.
301. Carter LL, Murphy KM. Lineage-specific requirement for signal transducer and activator of transcription (Stat)4 in interferon gamma production from CD4(+) versus CD8(+) T cells. *J Exp Med* 1999;189:1355-60.
302. D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM i sur. Production of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 1992;176:1387-98.
303. Cella M, Scheidegger D, Plamer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996;184:747-52.
304. Kubin M, Kamoun M, Trinchieri G. Interleukin-12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. *J Exp Med* 1994;180:211-22.
305. Casatella MA, Meda L, Gasperini S, D'Andrea A, Ma X, Trinchieri G. Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol* 1995;25:1-5.
306. D'Andrea A, Aste-Amezga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin-10 inhibits human lymphocyte IFN-g production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993;178:1041-8.
307. Wu C, Warriar RR, Wang X, Presky DH, Gately MK. Regulation of interleukin-12 receptor beta 1 chain expression and interleukin. 12 binding by human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Immunol* 1997;27:147-54.
308. Gerosa F, Paganin C, Peritt D i sur. Interleukin-12 primes human Cd4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon g and interleukin-10. *J Exp Med* 1996;183:2559-69.
309. Magram J, Connaughton SE, Warriar RR i sur. IL-12 deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responce. *Immunity* 1996;4:471-81.
310. Bellone G, Trinchieri G. Dual stimulatory and inhibitory effect of NK cell stimulatory factor/IL-12 on human hematopoiesis. *J Immunol* 1994;153:930-7.



311. Hirao A, Takaune Y, Kawano Y i sur. Synergism of interleukin-12, interleukin-3 and serum factor on primitive human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 1995;13:47-53.
312. Godfrey DI, Kennedy J, Gately MK, Hakimi J, Huggard BR, Zlotnik A. IL-12 influences intratimic T cell development. *J Immunol* 1994;152:2729-34.
313. Perussia B, Chan S, D'Andrea A i sur. Natural killer cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR $\alpha\beta$ +, TCR $\gamma\delta$ + T lymphocytes and NK cells. *J Immunol* 1992;149:3495-502.
314. Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM, Chizzonite R. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol* 1992;143:127-42.
315. Chehimi J, Valiante NM, D'Andrea A i sur. Enhancing effect of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12) on cell-mediated cytotoxicity against tumor-derived and virus-infected cells. *Eur J Immunol* 1993;23:1826-30.
316. Naume B, Gately M, Espevick T. A comparative study of IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor), IL-12 and IL-7 induced effects on immunogenetically purified CD56+ NK cells. *J Immunol* 1992;148:2429-36.
317. Cesano A, Visonneau S, Clark SC, Santoli D. Cellular and molecular mechanisms of activation of MHC nonrestricted cytotoxic cells by IL-12. *J Immunol* 1993;151:2943-57.
318. Hayakawa S, Nagai N, Kanaeda T i sur. Interleukin-12 augments cytolytic activity of peripheral and decidual lymphocytes against choriocarcinoma cell lines and primary culture human placental trophoblasts. *Am J Reprod Immunol* 1999;41:320-9.
319. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K i sur. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994;264:965-8.
320. Burton JD, Bamford RN, Peters C i sur. A lymphokine, provisionally designed interleukin T and produced by a human T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4935-9.
321. Armitage RJ, Macduff BM, Eisenman J, Paxton R, Grabstein KH. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J Immunol* 1995;154:483-90.
322. Carson WE, Fehiger TA, Haldar S i sur. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest* 1997;99:937-43.

323. Garcia VE, Jullien D, Song M, Uyemura K, Shuai K, Morita CT, Modlin RL. IL-15 enhances the response of human gamma delta T cells to nonpeptide microbial antigens. *J Immunol* 1998;160:4322-9.
324. Wilkinson PC, Liew FW. Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. *J Exp Med* 1995;95:1255-9.
325. Allavena P, Giardina G, Bianchi G, Mantovani A. IL-15 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their adhesion to vascular endothelium. *J Leukoc Biol* 1997;61:729-35.
326. Ma A, Boone DL, Lodolce JP. The pleiotropic functions of interleukin 15: not so interleukin 2-like after all. *J Exp Med* 2000;191:753-5.
327. Edelbaum D, Mohamadzadeh M, Bergstresser PR, Sugamura K, Takashima A. Interleukin (IL)-15 promotes the growth of murine epidermal gamma delta T cells by a mechanism involving the beta- and gamma c-chains of the IL-2 receptor. *J Invest Dermatol* 1995;105:837-43.
328. Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J *in vitro*. 1994. Utilisation of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *Eur Mol Bio Organ J* 1995;13:2822-30.
329. Chae DW, Nosaka Y, Strom TRB, Maslinski W. Distribution of IL-15 receptor alpha-chain on human peripheral blood mononuclear cells and effect of immunosuppressive drugs on receptor expression. *J Immunol* 1996;157:2813-19.
330. Anderson DM, Kumaki S, Ahdieh M *in vitro*. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL-15RA and IL2RA genes. *J Biol Chem* 1995;270:29862-69.
331. Tagaya Y, Burton JD, Miyamoto Y, Waldmann TA. Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15 in mast cells. *EMBO Journal* 1996;15:4928-39.
332. Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP, Waldmann TA. IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 1996;4:329-36.
333. Bamford RN, Battiata AP, Burton JD, Sharma H, Waldmann TA. Interleukin (IL)-15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region/IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2897-902.

334. Jonuleit H, Wiedemann K, Muller G i sur. Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 for attraction of T cells. *J Immunol* 1997;158:2610-5.
335. Quin LS, Haugk KL, Grabstein KH. Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology* 1995;136:3669-72.
336. Seder RA. High-dose IL-12 and IL-15 enhance the in vitro priming of naïve CD4+ T cells for IFN $\gamma$ , but have differential effects on priming for IL-4. *J Immunol* 1996;156:2413-22.
337. Mori O, Suko M, Kaminuma O i sur. IL-15 promotes cytokine production of human T helper cells. *J Immunol* 1996;156:2400-5.
338. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN i sur. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 2000;191:771-80.
339. Lodolce JP, Boone DL, Chai S i sur. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 1998;45:669-76.
340. Oteki T, Ho S, Suzuki H, Mak TW, Ohashi PS. Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1+T cell receptor-alpha beta+ cell development. *J Immunol* 1997;159:5931-5.
341. Suzuki H, Duncan GS, Takimoto H, Mak TW. Abnormal development of interstitial intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. *J Exp Med* 1997;185:499-505.
342. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 1998;8:591-599.
343. Mrozek E, Anderson P, Caligiuri MA. Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996;87:2632-40.
344. Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ i sur. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 1999;162:4511-20.
345. Ogasawara K, Hida S, Azimi N i sur. Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature* 1998;391:700-3.

346. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. IL-15, a novel cytokine produced by human fetal membranes, is elevated in preterm labor. *Am J Reprod Immunol* 1998;39:16-23.
347. Maezza R, Verdiani S, Biassoni R i sur. Identification of a novel interleukin-15 (IL-15) transcript isoform generated by alternative splicing in human small cell lung cancer cell lines. *Oncogene* 1996;12:2187-92.
348. Onu A, Pohl T, Krause H, Bulfone-Paus S, Regulation of IL-15 secretion via leader peptide of two IL-15 isoforms. *J Immunol* 1997;158:255-62.
349. Kitaya K, Jasuda J, Yagi I, Tada Y, Fushiki S, Honjo H. IL-15 expression at human endometrium and decidua. *Biol Reprod* 2000;63:683-7.
350. Okada S, Okada H, Sanezumi M, Nakajima T, Yasuda K, Kanzaki H. Expression of interleukin-15 in human endometrium and decidua. *Molecular Human Reprod* 2000;6:75-80.
351. Rukavina D, Rubeša G, Gudelj L, Haller H, Podack ER. Characteristic of perforin expressing lymphocytes within the first trimester decidua of human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1995;33:394-404.
352. Doherty TM, Seder RA, Sher A. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol* 1996;156:735-41.
353. Zygmunt M, Hahn D, Kiesenbauer N, Muntedt K, Lang U. Invasion of cytotrophoblastic (JEG-3) cells is up-regulated by interleukin-15 in vitro. *Am J Reprod Immunol* 1998;40:326-31.
354. Štrbo N, Laškarin G, Sotošek V, Vlastelić I, Podack ER, Rukavina D. The significance of IL-15 in regulation of perforin in the first trimester pregnancy decidual lymphocytes. *Period Biol* 1998;100:64 (Knjiga sažetaka s 4<sup>th</sup> International Meeting "Mechanisms in Local Immunity" Opatija, 23-25 rujana 1998.)
355. Tangri S, Raghupathy R. Expression of cytokines in placentas of mice undergoing immunologically mediated spontaneous fetal resorptions. *Biol Reprod* 1999;49:850-6.
356. Sotošek V, Laškarin G, Štrbo N, Dohr G, Blaschitz A, Podack ER, Rukavina D. Decidual macrophages are the population of decidual adherent cells which regulates perforin expression in the cytolytic cells. *Am J Reprod Immunol* 1999;42:76-82.
357. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-46.
358. Stern PL, Beresford N, Thompson S, Johnson PM, Webb PD, Hole N. Characterisation of human trophoblast-leukocyte antigenic molecules defined by a monoklonal antibody. *J Immunol* 1987;138:1088-91.

359. Lanier LL, Phillips JH, Hackett J, Tutt M, Kumar V. Natural killer cells: Definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* 1986;137:2375-82.
360. Rukavina D, Rubeša G, Gudelj L, Podack ER. Human decidual lymphocytes: phenotype, perforin expression and function. *Reg Immunol* 1994;6:320-5.
361. Štrbo N, Laškarin G, Sotošek V i sur. Natural killer activity and response to TH1 cytokines of decidual lymphocytes. Knjiga sažetaka sa "European meeting of Immunology of Reproduction" Rim, 2000; 28-29. listopad, str. 20.
362. Nagashima S, Mokinawa H, Yoda N, Niwa A. Essential role of high concentrations of interleukin-2 to maintain growth and functions of human interleukin-2 activated natural killer cells. *Int J Immunotherapy* 2000;16:1-11.
363. Gendron RL, Baines MG. Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice. *Cell Immunol* 1988;113:261-7.
364. Kinsky R, Delage G, Rosin N, Thang MN, Hoffmann M, Chaouat GA. Murine model for NK mediated resorption. *Am J Reprod Immunol* 1990;23:73-7.
365. Chao KH, Wu MY, Chen CD, Yang JH, Yang YS, Ho HN. The expression of killer cell inhibitory receptors on natural killer cells and activation status of CD4(+) and CD8(+) T cells in the decidua of normal and abnormal early pregnancies. *Human Immunol* 1999;60:791-7.
366. Mori T, Kobayashi H, Nashimoto H, Suzuki A, Nishimura T. Inhibitory effect of progesterone and 20-alfa hydroxypregn-4-n-3-one on the phytohaemagglutinin-induced transformation of human lymphocytes. *Am J Obstetr Gynecol* 1977;127:151-7.
367. Clark DA, Brierley J, Slapsys RM i sur. Trophoblast dependent and trophoblast independent suppressor cells of maternal origin in murine and human decidua. U: Clark DA, Croy BA, ur. *Reproductive Immunology*. Amsterdam: Elsevier; 1987, str. 219.
368. Chaouat G, Kolb JP, Kiger N, Stanislawski M, Wegmann TG. Immunological consequences of vaccination against abortion in mice. *J Immunol* 1985;134:1594-8.
369. Toder V, Strassburger D, Irlin I, Carp H, Pecht M, Trainin N. Nonspecific immunopotentiators and pregnancy loss: complete Freund adjuvant reverses high fetal resorption rate in CBA/J X DBA/2 mouse combination. *Am J Reprod Immunol* 1990;24:63-6.
370. Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Dubanchet S. Localisation of IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17 and IL-18 at the murine materno-foetal interface during murine

pregnancy: a challenge for the classical Th1/Th2 dichotomy. Knjiga sažetaka sa  
“The 6<sup>th</sup> Congress of the Alps-Adria Society of Immunology of Reproduction” Pecs,  
2000; 27-30 lipanj str.S3/3.

## ŽIVOTOPIS

**DATUM I MJESTO ROĐENJA:** 16. srpnja 1966. Rijeka

**ADRESA:** 51000 Rijeka, Hosti 99

**E-MAIL:** Gordana.Laskarin@medri.hr

### ZAPOSLENJA

02.01-31.05 1995. Dom zdravlja, Senj

01.03.1996. Zavod za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

### ŠKOLOVANJE

1973-1981. osnovna škola u Rijeci

1981-1985. srednja škola "CUO za kadrove u kulturi i obrazovanju", Rijeka

1985-1991. Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

1991-1992. Pripravnički staž u KBC Rijeka, (11. studenog 1992. položen državni ispit)

1992-1994. Poslijediplomski znanstveni studij iz "Opće kliničke patofiziologije" na Medicinskom fakultetu, Sveučilište u Rijeci

### AKADEMSKI STUPNJEVI

18.02.1992. Doktor medicine, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

01.03.1996.-01.03.1997. stručni suradnik na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

01.03. 1997-01.08.1999. mlađi asistent na Zavodu za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

01.08.1999. asistent na Zavodu za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

### ZNANSTVENI STUPNJEVI

23. prosinca 1998. Magistar znanosti iz područja biomedicine, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci. Naslov magistarskog rada: "Regulacija izražavanja citolitičkog proteina perforina u humanim decidualnim limfocitima". Mentor: Akademik Daniel Rukavina

## **SUDJELOVANJA NA MEĐUNARODNIM I DOMAĆIM SKUPOVIMA**

1. Međunarodni tečaj iz molekularne biologije tumora u organizaciji UICC-a (International Union Against Cancer), Trst i Rijeka, 20.-26. lipnja 1996.
2. Treći međunarodni kongres pod nazivom "Mechanisms in Local Immunity", Opatija, 26.-28. rujna 1996.
3. "Becton-Dickinson Facs Users Meeting", Portorož, 29. rujna - 01. listopada 1996.
4. Međunarodna razmjena mladih istraživača u organizaciji CEPUS-a, Pečuh, 01.-31. svibnja 1997.
5. "Becton-Dickinson Facs Users Meeting", Fifth Central European FACS Users Meeting", Pula, 05.-08. listopada 1997.
6. Stručno i znanstveno usavršavanje na Zavodu za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet u Grazu, Graz, 01. ožujka - 01. travnja 1998.
7. John Humphrey Course "Effector functions of immune cells", Dubrovnik, 11.-14. listopada 1998.
8. Bila sam prihvaćena u grupu od 30 polaznika tečaja "Frontiers in reproduction: Molecular and Cellular Concepts and Applications", koji se održavao od 20. svibnja do 1. srpnja 2001. u Woods Hole, Massachusetts, SAD.

## **ZNANSTVENA DJELATNOST**

### **Znanstveni radovi**

#### **Znanstveni rad objavljen u časopisu citiranom u tercijarnim publikacijama**

1. Gudelj, L., Christmas, S.E., Laškarin, G., Johnson, P.M., Podack, E.R., and Rukavina, D.: "Membrane phenotype and expression of perforin and serine esterases by CD3<sup>+</sup> peripheral blood and decidual granular lymphocyte-derived clones", *Am. J. Reprod. Immunol.*, 38:162-167, 1997.
2. Daniel Rukavina, Gordana Laškarin, Gordana Rubesa, Natasa Štrbo, Ivica Bedenicki, Darko Manestar, Mario Glavas, Stephen E Christmas, Eckhard R Podack: The age related decline of perforin expression in human cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells, *Blood*, Vol 92, No 7: 2410-2420, 1998.
3. Štrbo N., Laškarin G., Sotošek V., Randić Lj., Podack E.R., Rukavina D. Modulation of perforin expression in the decidual and peripheral blood cytotoxic lymphocytes in culture. *Am. J. Reprod. Immunol.* 42:14-21, 1999.



4. Sotošek V., Laškarin G., Štrbo N., Dohr G., A. Blaschitz, Podack E.R., Rukavina D. Decidual macrophages are the population of decidual adherent cells which regulates perforin expression in cytolytic cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 42:76-82, 1999.
5. Faust Zs., Laškarin G., Rukavina D., Szekeres-Bartho J. Progesterone-Induced Blocking Factor inhibits degranulation of natural killer cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 42:71-75, 1999.
6. Laškarin G., Faust Zs., Štrbo N., Sotošek V., Podack E.R., Szekeres-Bartho J., Rukavina D. Progesterone directly and indirectly affects perforin expression in cytolytic cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 42:5, 312-320, 1999.

#### **Znanstveni radovi u tisku:**

1. G. Laskarin, V. Sotosek, N. Strbo, T. Bogovic, J. Szekeres-Bartho, Lj. Randic, E.R. Podack and D. Rukavina. Progesterone Induced Blocking Factor (PIBF) medaiates progesterone induced suppression of decidual lymphocyte cytotoxicity. *Am J Immunol Reprod.* br. AJI1-0133 SI.
2. V. Sotosek Tokmadzic, Y. Tsuji, T. Bogovic, G. Laskarin, K. Cupurdija, N. Strbo, K. Koyama, H. Okamura, ER. Podack and D. Rukavina. IL-18 is present at the maternal-fetal interface and enhances cytotoxic activity of decidual lymphocytes. *Am J Immunol Reprod.* br. AJI2-0132 SI.

#### **Znanstveni rad objavljen u časopisu citiranom u sekundarnim publikacijama**

1. D. Rukavina, N. Štrbo, V. Sotošek, I. Bedenicki, G. Laškarin: Recent Advances in immunology of early pregnancy, *Gynaecol. Perinatol.* 1998;7:77-83.
2. Daniel Rukavina, Gordana Laškarin, Nataša Štrbo, Vlatka Sotošek, Tatjana Bogović: Immunobiology of reproduction: Role of uniquely abundant NK cells in the placenta, *AMLI Twelfth Annual Meeting and Update in Clinical Immunology*, Bethesda, Maryland, USA, July 6-10, 1999, *Clinical Immunology Newsletter* 1999;19:59-61.

#### **Poglavlje u knjizi**

Rukavina D., Bedenicki I., Laškarin G., Balen-Marunić S. and Vlastelić I.: Physiology and Pathophysiology of Perforin Mediated Cytotoxicity, IVth Conference of the

International Foundation for Pulmonology, Allergology and Immunological Related Disorders (IFPAIRD), Debrecen, Hungary, 28.-29. kolovoza 1997, str. 134-139.

## **PROJEKTI**

### **Aktivno sudjelovanje u realizaciji znanstvenih projekata**

1. "Psihosocijalna pomoć prognanicima i izbjeglicama" od 1. ožujka 1993. do 31. prosinca 1994. Projekt je financirao UNHCR.
2. "Ekspresija perforina u limfocitima periferne krvi i decidualnim limfocitima u trudnoći" (br. 006201) (Kratki naslov: "Ekspresija perforina u trudnoći") glavnog istraživača Akademika Daniela Rukavine. Projekt financira Ministarstvo znanosti i tehnologije Republike Hrvatske.

## **SUDJELOVANJE NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA**

### **Sudjelovanje na međunarodnim skupovima**

Od 1996. godine sudjelovala sam na međunarodnim skupovima sa sveukupno 28 sažetaka.

### **Sudjelovanje na domaćim skupovima**

Od 1996. godine sudjelovala sam na domaćim skupovima sa sveukupno 12 sažetaka.

### **Pozvana predavanja**

#### **Pozvana predavanja na međunarodnim skupovima**

1. Workshop "Role of cytokines/immune cells at the interface" s predavanjem "Immunological roles of progesterone", International Federation of Placenta Association Meeting 1999, 8<sup>th</sup> Meeting of the European Placenta Group (joint meeting), Schladming, Austria, September, 26-29, 1999.
2. Workshop: "Informational mediators in pregnancy" s predavanjem Progesterone mediated regulation of cytolytic potential of decidual lymphocytes. "VIII International Congress of Reproductive Immunology" Opatija, Hrvatska, 2.-6. srpnja 2001. Am J Reprod Immunol 2001;46: 40.

#### **Pozvana predavanja na domaćim skupovima**

1. "4<sup>th</sup> Croatian International Scientific Symposium" s predavanjem " Immunological functions of progesterone in pregnancy", European Medical Student Association (EMSA), Croatia, Rijeka, April, 7-9, 2000.

2. Pozvani predavač na "2000 godišnji sastanak hrvatskog imunološkog društva", "Utjecaj progesterona i citokina na regulaciju citolitičke aktivnosti decidualnih limfocita". Hrvatsko imunološko društvo, Zagreb, Hrvatska, 15. prosinca, 2000.

#### **ZNANSTVENE NAGRADE / PRIZNANJA**

1. Na prvom Europskom skupu imunologije i reprodukcije (European Meeting of Immunology and Reproduction), koji je održan 28.-29. listopada 1999. godine u Rimu, moj rad "The influence of progesterone in regulation of perforin expression and cytolytic activity of decidual lymphocytes", koji sam usmeno prezentirala kao pozvani mladi znanstvenik, nagrađen je nagradom za najbolje znanstvene radove prezentirane na tom skupu.
2. Dobitnica sam "Godišnje državne nagrade za znanstvene novake za 2000." Ministarstva znanosti i tehnologije Republike Hrvatske, koja mi je dodijeljena 29. svibnja 2001. u Zagrebu.

#### **ZNANSTVENA DRUŠTVA**

1. International Society for Immunology of Reproduction (ISIR)
2. "Alps -Adria Society for Immunology of Reproduction" (AASIR)
3. Hrvatsko imunološko društvo (HID).
4. Hrvatsko društvo fiziologa (HDF).

#### **NASTAVNA DJELATNOST**

1987-1990. Student-demonstrator na Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

Od 1996. godine aktivno sudjelujem u nastavi u izvođenju seminara i vježbi iz predmeta Fiziologija, Imunologija, Neurofiziologija i Patofiziologija za studente sveučilišnih studija opće medicine i stomatologije, te predmeta Fiziologija s patofiziologijom za studij diplomiranih sanitarnih inženjera.

Voditelj sam kolegija Fiziologija s patofiziologijom na Veleučilištu u Rijeci za studij Inženjeri medicinsko laboratorijske dijagnostike.

STROGOM POUZANJU  
21. 5. 2001.