



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Anna Miskova

AUGŠANAS FAKTORU,
GĒNU UN TO PRODUKTU
SADALĪJUMS I TRIMESTRĪ
CILVĒKA EMBRIJU
IMPLANTĀCIJAS
GADĪJUMOS OLVADĀ UN
DZEMDĒ

Promocijas darba
kopsavilkums

Specialitāte – Morfoloģija

Rīga, 2012

Promocijas darbs veikts Rīgas Stradiņa Universitātes
Anatomijas un antropoloģijas institūtā Morfoloģijas katedrā

Darba zinātniskaie vadītāji: *Dr. habil. med.*, profesore Māra Pilmane
AAI RSU un *Dr. med.*, asociētā profesore Dace Rezeberga
Dzemdniecības un ginekoloģijas katedra RSU

Oficiālie recenzenti: *Dr. med.*, asociētā profesore Ilze Štrumfa RSU; *Dr. med. vet.*, asociētā profesore Ilze Matīse-Van Houtana LLU VMF; *Dr. med.* Kristiina Rull Tartu universitāte (Igaunija).

Promocijas darba aizstāvēšana notiks “2012”. gada “___”. _____
plkst. _____ Rīgas Stradiņa universitātes Teorētiskās medicīnas
Promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta
auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā:
www.rsu.lv

Promocijas darbs veikts ar Eiropas sociālā fonda projekta “Atbalsts
doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei
Rīgas Stradiņa universitātē” finansiālu atbalstu



Promocijas padomes sekretāre: *Dr. habil. med.*, profesore Līga
Aberberga - Augškalne

Copyright © Anna Miskova, 2012

All right reserved. No part of this publication may be reproduced in any
form without permission in writing from the author, except for scientific
citations.

SATURS

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI	4
PETĪJUMA AKTUALITĀTE	6
DARBA HIPOTĒZE	7
DARBA UZDEVUMI	7
DARBA NOVITĀTE	8
MATERIĀLI UN METODES	9
REZULTĀTI	14
Ektopiskas grūtniecības audu morfoloģiskais raksturojums	14
Dzemes grūtniecības morfoloģiskais raksturojums	14
Embrija audu raksturojums	15
Olvada grūtniecības augšanas faktori, receptori, MMPs, cilvēka defensīns beta 2, apoptoze	15
Dzemes grūtniecības augšanas faktori, receptori, cilvēka defensīns beta 2, apoptoze	18
Augšanas faktori un to receptori, neuropeptīdi, CK, cilvēka defensīns beta 2, apoptoze embriju audos	19
Statistiskā datu analīze	23
DISKUSIJA	27
SECINĀJUMI	41
PUBLIKĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU	43
PETĪJUMA APROBĀCIJA	46

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

Saīsinājums	Nosaukums angļu valodā	Tulkojums latviešu valodā
AFP	alpha-fetoprotein	alfa-fetoproteīns
BARX1	barx1 homeobox gene	homeoboksa barx1 gēns
bFGF	basic fibroblast growth factor	bāziskais fibroblastu augšanas factors
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	cikliskais adenozinamonofosfāts
CB	canabioīd (endogenous)	kanabioīds (endogēnais)
CNS	central nerve system	centrālā nervu sistēma
<i>Conceptus</i>	the product of the union of oocyte and spermatozoon at any stage of development including	ielīgzenis
DNS	deoxiribonucleic acid	dezoksiribonukleīnskābe
EGF	epidermal growth factor	epidermālais augšanas factors
FGFR1	fibroblast growth factor receptor1	fibroblastu augšanas faktora 1 receptors
FSH	follicle stimulating hormone	folikulu stimulējošais hormons
GFAP	glial fibrillary acidic protein	glijas fibrilārais skābais proteīns
HB-EGF	heparin binding epidermal growth factor	heparīnu piesaistošais augšanas factors
HGF	hepatocyte growth factor	hepatocītu augšanas factors
hCG	human chorionic gonadotropine	cilvēka horiona gonadotropīns
HOXA10	homeobox protein a 10	<i>homeobox</i> olbaltumviela 10
hPL	human placental lactogen	cilvēka placentārais laktogēns
ICC	interstitial cells of cajal	intersticiālās kajala šūnas
IGF-1	insulin-like growth factor 1	insulīnam līdzīgais augšanas faktors 1
IGF-1R	insulin-like growth factor 1 receptor	insulīnam līdzīgā augšanas faktora 1 receptors
IGFBP-1	insulin-like growth factor 1 binding protein	insulīnam līdzīgā augšanas faktora 1 piesaistes olbaltumviela
IIS	pelvic inflammatory disease	iegurņa iekaisuma slimība
IL	interleukin	interleikīns

Saīsinājums	tabulas nobeigums	
	Nosaukums angļu valodā	Tulkojums latviešu valodā
iNOS	inducible nitric oxide synthase	inducējama slāpekļa oksīda sintāze
IUS	intrauterine device	intrauterīna spirāle
IVF	<i>in vitro</i> fertilization	ārpusdzemdes apaugļošana
LIF	leukaemia inhibiting factor	leikēmiju inhibējošais faktors
MMP	matrix metalloproteinase	matrices metaloproteināze
Msx2	muscle segment homeobox 2 gene	muskuļu segmentu homeoboksa gēns 2
NGF	basic nerve growth factor	bāziskais nervu augšanas faktors
NGFR	nerve growth factor receptor	nervu augšanas faktora receptors
PAPP-1	pregnancy associated paraproteine a	ar grūtniecību saistītais paraproteīns a
PDGF	platelet derived growth factors	trombocītu atvasinātais augšanas faktors
PGP 9.5	protein gene product 9.5	proteīngēnviela 9.5
PNS	peripheral nerve system	perifērā nervu sistēma
PROKR	prokinetocine receptor	prokinetocīnu receptors
Sox17	sry (sex determining region y)-box 17 gene	sox17 (dzimumnoteicošā rajona) gēns
STS	sexually transmitted disease	seksuāli transmisīva saslimšana
TGF beta 1	transforming growth factor-beta 1	transformējošais augšanas faktors beta 1
TNF alfa	tumour necrosis factor alpha	audzēja nekrozes faktors alfa
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dutp nick end labeling	deoksinukleotidiltransferāzes mediēta dns terminālo 3`- galu marķēšana ar deoksiuridinfosfātu
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulārais endotēlija augšanas faktors

PETĪJUMA AKTUALITĀTE

Embrija implantācija ir sarežģīts process, kurā notiek mātes un *conceptus* šūnu diferenciācija, proliferācija un invāzija un kurš ir nepieciešams grūtniecības sekmīgai attīstībai. Sekmīgai implantācijai ir vajadzīgs funkcionāli normāls embrijs blastocistas stadijā un receptors (uztverošs) endometrijs, kas izveidojas, pastāvot mātes un embrija šūnu signālmolekulu izdalei. Tikai 25–30% no apaugļotām olšūnām attīstās līdz dzīvi dzimušajam jaundzimušam (Macklon *et al.*, 2002). Aptuveni 30% no neveiksmīgām implantācijām ir saistīti ar traucētu endometrija receptivitāti (Chard, 1991), bet 1–2% no visām implantācijām ir ektoiskas (Farquhar, 2005; Varma un Gupta, 2009). Pašreiz nav pilnībā noskaidrots, kādu faktoru ietekmē notiek blastocistas implantācija.

Pēc Pasaules Veselības organizācijas (PVO) datiem, aptuveni 1 no 250 implantācijām (visā pasaulē ik stundu noris aptuveni 7 implantācijas) notiek ārpus dzemdes, tas rada briesmas ne tikai mātes reproduktīvajai veselībai, bet pat viņas dzīvībai (Varma and Gupta, 2009).

Ārpusdzemdes grūtniecības rezultātā sievietes reproduktīvā veselība un spējas radīt pēcnācējus var pasliktināties. Ņemot vērā to, ka ārpusdzemdes grūtniecības agrīna un savlaicīga diagnostika ir nozīmīga klīniska problēma, ir svarīgi izpētīt tās morfoloģenēzi.

Augšanas faktori ir nozīmīgi šūnu proliferācijas, migrācijas un diferenciācijas procesos, bet pareiza noteiktu gēnu ekspresija vai „klusēšana” koordinē cilvēka embrija attīstību (Attar, 2004). Iespējams, ka blastocistas implantācijas vieta ir atkarīga no izdalīto augšanas faktoru mijiedarbības ar mātes audiem, kas nosaka tiešu implantācijas lokalizāciju un turpmāko embrija attīstību. Piemēram, ir zināms, ka cilvēka deciduālās šūnas embrija implantācijas vietā izdala insulīnam līdzīgo augšanas faktoru (IGF-1), taču

peles ar nulles IGF-1 gēnu ir neauglīgas (*Kapur et al.*, 1992; *Baker et al.*, 1996).

Dažādas implantācijas gadījumos augšanas un transkripcijas faktoru sadale ir maz izpētīta, nav noteikta faktoru nozīme patoģenēzē un iespēja atbilstošu faktoru diagnostiku lietot klīnikā.

Dotā darba mērķis bija izpētīt dažādu augšanas faktoru, Msx2, BARX1, cilvēka defensīna beta 1 ekspresijas sadalījumu un noteikt apoptotiskās šūnas cilvēka embrija audos pirmajā trimestrī, kā arī noteikt mineto faktoru nozīmi olvada grūtniecības patoģenēzē.

DARBA HIPOTĒZE

1. Cilvēka embrija implantācijas vieta ir atkarīga no lokāla augšanas faktoru, augšanas faktoru receptoru un gēnu sadalījuma un ekspresijas
2. Cilvēka embrija olvada implantācijas gadījuma ir sava raksturīga augšanas faktoru, augšanas faktoru receptoru sadale audos

DARBA UZDEVUMI

1) audu iegūšana no pieejamiem cilvēka embrijiem, kuru attīstība tikusi pārtraukta mākslīgas grūtniecības pārtraukšanas operācijas laikā pirms 12. gestācijas nedēļas pēc sievietes vēlēšanās;

2) olvadu audu iegūšana ārpusdzemdes grūtniecības operācijas materiālā;

3) endometrija audu iegūšana ķirurģiskā aborta operācijas materiālā;

- 4) histoloģiskas pārskata ainas aprakstīšana;
- 5) augšanas faktoru imūnhistoķīmiska noteikšana;
- 6) mezenhīmu ietekmējošo gēnu un transkripcijas faktoru ekspresijas izpēte agrīnās embrija attīstības stādijās;
- 7) izmantot *TUNEL* metodi apoptotisku šūnu noteikšanai dažādos cilvēka embrija audos;
- 8) statistiskās analīzes veikšana par iespējamo augšanas faktoru un gēnu ekspresijas korelāciju nepareizas blastocistas implantācijas gadījumā.

DARBA NOVITĀTE

1. Pirmo reizi ir veikta 5./6.–12. gestācijas nedēļu spontānas fizioloģiskas grūtniecības endometrija un embrija audu ekspresēto augšanas faktoru, to receptoru un mezenhīmu ietekmējošo gēnu imūnhistoķīmiskā, kā arī apoptozes analīze.
2. Pirmo reizi ir veikta olvada audu ekspresēto augšanas faktoru un to receptoru imūnhistoķīmiskā, kā arī apoptozes analīze ektopiskas grūtniecības gadījumā.
3. Ir pierādīta IGF-1, IGF-1R, FGFR1, bFGF, NGF, NGFRp75, PGP 9.5, HGF, cilvēka defensīna beta 2, MMP 9 un MMP 2 nozīmē olvada grūtniecības gadījumā
4. Pirmo reizi parādīta cilvēka defensīna beta 2 sadale cilvēka embrija audos 5

MATERIĀLI UN METODES

Pētījumā iekļautas trīs audu grupas:

- 1) olvada audi ārpusdzemdes grūtniecības operācijas materiālā;
- 2) ķirurģiskā aborta operācijas materiāls;
- 3) embrija audi ķirurģiskā aborta operācijas materiālā.

Pētījums tika veikts saskaņā ar RSU Ētikas komisijas atļauju (18.12.2007), un tā rezultātā netika nodarīts kaitējums sievietes veselībai.

Pētījumam tika izmantoti olvada audi no 17 pacientēm ar plīsu vai progresējošu olvada grūtniecību. Tie tika iegūti salpingektomijas laikā, iepriekš saņemot pacientes informēto piekrišanu Pētījumā iekļāvām tikai tādas pacientes, kurām bija iespējama vienīgi operatīva ārpusdzemdes grūtniecības ārstēšana, proti, olvada izņemšana. Operācijas pieeja konvencionālā vai endoskopiskā metode, bija atkarīga no pacientes stāvokļa un tehniskām iespējām.

Olvada grūtniecības audus salīdzinājām ar dzemdes grūtniecības audiem, kas tika iegūti no 10 pacientēm, kuras pārtrauca grūtniecību pēc savas vēlēšanās. Grūtniecība tika pārtraukta ar ķirurģisku metodi, proti, dzemdes kiretāžu, pēc kuras audi tika savākti un fiksēti. Turpmākā audu šķirošana tika veikta RSU AAI Morfoloģijas laboratorijā. Operācijas materiālā atradām divus veselus embrijus un embriju audu fragmentus, proti, ekstremitātes, iekšējo orgānu kompleksu un galvu.

Audu paraugus ņēmām laika posmā no 2007. g. līdz 2008. gadam Rīgas 1. slimnīcā un SIA „Medicīnas centrā Elite”. Kopējais pacienšu skaits pētījumā – 27. Katrai pacientei tika piešķirts kārtas numurs, lai nodrošinātu personas datu neizpaušanu pētījuma gaitā, un savākti anamnēzes dati. Anketēšanu veica pētnieks pirms operācijas. Mūs interesēja dati par pacientes vecumu, grūtniecību, abortu, IIS epizožu un partneru skaitu, STS un olvada

operācijām anamnēzē. Dokumentējām arī kontracepcijas metodes, ko izmantoja pacientes. Grūtniecības laiku noteicām pēc pēdējo menstruāciju pirmās asiņošanas dienas.

No katras pacientes operācijas laikā iegūtā audu materiāla tika sagatavoti 5µm biezi griezumī kurus krāsoja ar hematoksilīnu un eozīnu un sagatavoja, lai ar biotīna – streptavidīna imūnhistoķīmijas metodi noteiktu augšanas faktoru, to receptoru, Msx2, BARX1 un cilvēka defensīna beta 2 sadalījumu audos. Antivielas, kas tika izmantotas augšanas faktoru, neuropeptīdu un gēnu imūnhistoloģiskai noteikšanai, ir aprakstītas 2.1. tabulā.

Apoptozes noteikšanai tika izmantots standartizētas tehnikas komplekts *In Situ Cell Death Detection, POD Cat. No. 11684817910 Roche Diagnostics*.

Nokrāsotie preparāti tika analizēti, izmantojot gaismas mikroskopijas tehniku, respektīvi, ar *Leica DM RB* (Vācija) mikroskopu, pēc tam – ar programmu *Image Pro Plus* videoattēlu analizatoru sistēmā. Histoloģiskā aina tika fiksēta ar *Leica Microsystem AG* (Vācija) digitālo kameru.

Imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvā biežuma apzīmēšanai tika lietota puskvantitatīvās skaitīšanas metode. Struktūru daudzums tika analizēts nejauši izvēlētos viena griezumā piecos redzes laukos. Puskvantitatīvajai metodei tika izmantoti 2.2. tabulā dotie apzīmējumi.

Izmantojot *TUNEL* metodi, arī nejauši tika izvēlēti 5 redzes lauki, kuros no 100 redzamām šūnām tika skaitītas pozitīvās apoptotiskās šūnas (pozitīvais krāsojums kodolos). Tika noteikts arī apoptotiskais indekss: apoptotisko šūnu attiecība pret visām pārējām šūnām no 100 skaitītajām.

Pētījumā izmantotās antivielas

Faktors	Kods	No kā iegūts	Darba atšķaidījums	Ražotājs
BARX1	ab26156	truša	1:250	<i>Abcam,</i> Lielbritānija
bFGF	ab16828	truša	1:200	<i>Abcam,</i> Lielbritānija
Cilvēka defensīns beta 2	AF2758	kazas	1:100	<i>RnDsystems,</i> Vācija
CK13	ab58744	truša	1:250	<i>Abcam,</i> Lielbritānija
CK5	ab24647	truša	1:1000	<i>Abcam,</i> Lielbritānija
FGFR1	ab10646	truša	1:100	<i>Abcam,</i> Lielbritānija
GFAP	M0761	peles	1:50	<i>DakoCytomation,</i> Dānija
HGF	AF-294-NA	kazas	1:300	<i>RnDsystems,</i> Vācija
Hromogranīns A un B	B315100	peles	1:10	<i>DakoCytomation,</i> Dānija
IGF-1	MAB291	kazas	1:100	<i>RnDsystems,</i> Vācija
IGF-1R	AF-305-NA	peles	1:100	<i>RnDsystems,</i> Vācija
Kaspāze 6	ab52951	peles	1:100	<i>Abcam,</i> Lielbritānija
MMP 2	AF902	kazas	1:100	<i>RnDsystems,</i> Vācija
MMP 9	AF911	kazas	1:250	<i>RnDsystems,</i> Vācija
Msx2/HOX8	ab22601	peles	1:250	<i>Abcam,</i> Lielbritānija
NGF bāziskais	ab6199	truša	1:500	<i>Abcam,</i> Lielbritānija
NGFRp75	M3507	Peles	1:150	<i>DakoCytomation,</i> Dānija
PGP 9.5	Z 5116	Truša	1:150	<i>DakoCytomation,</i> Dānija
Sinaptofizīns	M0776	Peles	1:10	<i>DakoCytomation,</i> Dānija
TGF beta 1	ab1279	Peles	1:1000	<i>Abcam,</i> Lielbritānija

Puskvantitatīvās metodes apzīmējumi

Apzīmējums	Skaidrojums
0	redzes laukā netika redzēta neviens pozitīva struktūra
+	redzes laukā – maz pozitīvu struktūru
++	redzes laukā – vidēji daudz pozitīvu struktūru
+++	redzes laukā – daudz pozitīvu struktūru

Pētījuma grupu vispārīgai raksturošanai tika lietotas vispārpieņemtās aprakstošās statistikas metodes. Iegūto datu puskvantitatīvai izvērtēšanai tika izmantotas neparametriskās statistikas metodes. Divu neatkarīgu grupu salīdzināšanai, lietojot rangu skalas lielumus, tika lietots Manna–Vitnija (*Mann–Whitney*) tests. Rezultāti tika uzskatīti par ticamiem, ja $p < 0,05$. Vairāku izlašu salīdzināšanai tika izmantots Kraskela–Vollisa (*Kruskal–Wallis*) tests. Korelācijas koeficients ir divu vai vairāku mainīgu lielumu saistības ciešuma kvantitatīvs rādītājs. Pēc rangu skalas lielumiem tika aprēķināts t.s. Spīrmēna korelācijas koeficients. Pētījumā kvalitatīvā saistība starp mainīgajiem, balstoties uz korelācijas koeficienta lielumu, tika novērtēta kā vāja, vidēja vai cieša. Korelācijas koeficienta sadalījums bija šāds: $r = 0–0,3$ – vāja, maznozīmīga korelācija; $r = 0,4–0,7$ – vidēja korelācija; $r = 0,7–0,9$ – cieša korelācija. Statistiskā analīze veikta, izmantojot SPSS 17 (*SPSS Inc., USA*).

REZULTĀTI

Ektopiskas grūtniecības audu morfoloģiskais raksturojums

Analizējot morfoloģisko ainu pārskata griezumos, tika konstatētas tūskainas, izteikti zarotas olvada bārkstiņas un masīvi asins izplūdumi. Atsevišķos gadījumos olvada epitēlijā atradām bazālo epiteliocītu proliferāciju. Olvadu gļotādas saistaudos novērojām dažādas pakāpes limfocītu, leukocītu un makrofāgu infiltrāciju, asins kapilāru pilnasinību. Olvada *lamina propria* tika novērotas perifērā trofoblasta šūnas. Mūsu pārskata griezumos tika konstatētas arī olvada sienā iesaistītas horija bārkstiņas, fibrinoīds. Horija bārkstiņas sasniedza muskuļu apvalku, kurš vietām bija plāns, atrofisks.

No embrionālajiem audiem olvada lūmenā tika atrastas sekundārās trofoblasta bārkstiņas, kas bija saistītas ar olvada struktūrām vai ar dīgļa apvalkiem. No embrioblasta atvasināti orgānu audi ārpusdzemdes grūtniecības pētījuma gaitā netika iegūti.

Dzemes grūtniecības morfoloģiskais raksturojums

Endometrija preparātos tika novērotas tipiskas grūtniecības izmaiņas, t.i., paplašinātas zigzagveidīgi izlocītas dzemes kriptas, klātas ar gaišām vienkārtaina kubiska epitēlija šūnām. Endometrija kompaktajā atlobenes slānī lokalizētas perifērā trofoblasta šūnas, graudainie leukocīti un makrofāgi. Spirālveidīgas arteriolas formējas kompaktajā slānī. Morfoloģiskās ainas atšķirības pacientēm netika novērotas.

Horija bārkstiņas, augļa apvalku fragmenti un embrija orgānu fragmenti katrai pacientei liecināja par grūtniecības esamību dzemdē.

Embrija audu raksturojums

Horija bārkstiņas un augļa apvalku paliekas tika novērotas katrā preparātā. Dažādi embrija orgānu fragmenti tika konstatēti visos dzemdes grūtniecības preparātos. Pētījuma gaitā tika iegūti divi veseli embriji un astoņu embriju ķermeņu fragmenti. Embrionālās attīstības laiks bija no 5./6. līdz 12. embrionālās attīstības nedēļai, bet Karnegi sistēmā – no 18. līdz 23. stadijai

Pārskata preparātos konstatējām embrija CNS elementus, proti, muguras smadzenes, galvas smadzeņu fragmentus un spinālos ganglijus.

Deviņiem embrijiem tika iegūti iekšējo orgānu – sirds, plaušu, aknu un *mesonephros* vai *metanephros* fragmenti. Embrionālā skeleta sistēma arī tika iegūtā pētījumā gaitā: rokas, mugurkaula un ribu fragmenti demonstrēja embrija endohondrālās pārkaulošanās norisi.

Praktiski visu embrionālo orgānu – CNS, iekšējo orgānu, ekstremitāšu – struktūra atbilda gestācijas laikam un radīja priekšstatu par normālu embrionālu attīstību.

Olvada grūtniecības augšanas faktori, receptori, MMPs, cilvēka defensīns beta 2, apoptoze

Transformējošais augšanas faktors beta 1: TGF beta 1 pozitīvi nokrāsotas šūnas netika konstatētas olvada ārpusdzemdes grūtniecības audos.

Bāziskais fibroblastu augšanas faktors un tā receptors 1: praktiski visiem olvada audiem bija raksturīgs mazs bFGF pozitīvo struktūru daudzums. Atsevišķu epiteliocītu, endoteliocītu, mezoteliocītu citolemmas un miocītu sarkolemmas saturēja bFGF. Atsevišķas bFGF pozitīvās šūnas, t.i., makrofāgus un neitrofilos leukocītus, novērojām perifērajā trofoblastā un olvada saistaudos.

Citotrofoblastā, sincītijtrofoblastā un ekstraembrionālajā mezenhīmā bFGF pozitīvās šūnas netika konstatētas.

Konstatējām daudz vai vidēji daudz FGFR1 saturošas struktūras kā olvada audos, tā arī trofoblastā. Olvada epitēlijā un gludajā muskulatūrā tika novērots daudz FGFR1 pozitīvo šūnu. Asinsvadu sienā un mezotēlijā bija vidēji daudz FGFR1 pozitīvo šūnu. Olvada gļotādas saistaudos tika novērots maz FGFR1 pozitīvo makrofāgu un neitrofilo leukocītu. Perifērajā trofoblastā arī redzējām maz FGFR1 pozitīvo šūnu.

Embrija audos, respektīvi, sincītijtrofoblastā un citotrofoblastā, arī tika konstatēts vidēji, bet ekstraembrionālajā mezenhīmā – daudz FGFR1 pozitīvo struktūru.

Bāziskais nervu augšanas faktors un tā receptors p75: bāzisko NGF konstatējām praktiski visās struktūrās. Olvada epitēlijā, gludajā muskulatūrā, endotēlijā un nervu šķiedrās atklājām vidēji daudz NGF pozitīvo struktūru. Olvada mezotēlijā, kā arī ekstraembrionālajā mezenhīmā un perifērajā trofoblastā bija maz NGF pozitīvo šūnu. Daudz citotrofoblasta šūnu bija NGF pozitīvās šūnas, bet sincītijtrofoblastā NGF pozitīvās šūnas netika novērotas. NGFRp75 saturēja tikai nervu šķiedras olvada *lamina propria* un muskuļapvalkā.

Insulīnam līdzīgais augšanas faktors un tā receptors: daudz IGF-1 pozitīvo struktūru bija atrodamas olvada epitēlijā, bet tikai atsevišķu epiteliocītu apikālā virsma saturēja IGF-1R. IGF-1R netika atrasts citās struktūrās, izņemot mezotēliju, kurā bija vidējs daudzums IGFR-1 pozitīvo šūnu.

Olvada saistaudos makrofāgi un neitrofilie leukocīti ekspresēja IGF-1. Citotrofoblasts un sincītijtrofoblasts olvada grūtniecības gadījumā saturēja vidēju daudzumu IGF-1 pozitīvo šūnu. Atsevišķas ekstraembrionālās mezenhīmas šūnas arī saturēja IGF-1. Perēķ]veidā lokalizētas IGF-1 pozitīvās šūnas tika atrastas perifērajā trofoblastā.

Hepatocītu augšanas faktors: olvada epitēlijs saturēja daudz HGF pozitīvo šūnu. Asinsvadu sienā, gludajā muskulatūra novērojām daudz HGF pozitīvo struktūru. Perifērais trofoblāsts, kā arī citotrofoblāsts un sincītijtrofoblāsts saturēja daudz HGF pozitīvo šūnu.

Ekstraembrionālā mezenhīma novērojām vidēji daudz HGF pozitīvo struktūru. HGF pozitīvās šūnas netika konstatētas olvada saistaudos. Nervu šķiedrās bija HGF negatīvas. Mezotēlijā netika atrastas HGF pozitīvas šūnas.

Olvada grūtniecības inervācija: proteīngēni 9.5: daudz PGP 9.5 saturošo struktūru tika konstatēti olvada epitēlijā gan šūnu, gan neuroepitēliālo ķermenīšu veidā un nervu šķiedrās. Perifērā trofoblāstā novērojām daudz PGP 9.5 pozitīvo šūnu. Olvada *lamina propria* atradām vidēji daudz PGP 9.5 saturošus makrofāģus un neitrofilos leukocītus.

Olvada grūtniecības audu deģenerācijas enzīmi: olvada grūtniecības gadījumā novērojām daudz MMP-2 pozitīvo struktūru olvada epitēlijā, endotēlijā, gludajā muskulatūrā, nervu šķiedrās, mezotēlijā. Olvada gļotādas saistaudos konstatējām daudz MMP-2 saturošus makrofāģus un neitrofilos leukocītus. Daudz MMP-2 pozitīvo šūnu konstatējām arī citotrofoblāstā, sincītijtrofoblāstā un ekstraembrionālajā mezenhīmā.

Olvada epitēlija novērojām vidēji daudz MMP 9 pozitīvo šūnu. Endotēlijā un olvada gļotādas saistaudos novērojām vidēju daudzumu MMP 9 pozitīvo struktūru.

Mazs MMP 9 pozitīvo struktūru daudzums bija atrodams gludajā muskulatūrā, mezotēlijā un nervu šķiedrās. Citotrofoblāstā, sincītijtrofoblāstā un perifērajā trofoblāstā tika konstatēti vidēji, bet ekstraembrionālajā mezenhīmā – mazs MMP 9 pozitīvo šūnu daudzums.

Olvada grūtniecības programmētā šūnu nāve: olvada epitēlijā bija daudz apoptotisko šūnu. Apoptotiskais indekss olvada epitēlijā bija 75%. Vidējs daudzums apoptotisko šūnu tika konstatēti olvada *lamina propria* saistaudos, asinsvados, muskuļu apvalkā un mezotēlijā. Citotrofoblāstā,

sincītijtrofoblastā, ekstraembrionālajā mezenhīmā un perifērajā trofoblastā arī bija vidējs daudzums apoptotisko struktūru.

Olvada grūtniecības antimikrobās aizsardzības olbaltumvielas: vidēji daudz cilvēka defensīna beta 2 pozitīvo šūnu tika konstatētas olvada epitēlijā. Cilvēka defensīna beta 2 granulas koncentrējās olvada epiteliocītu citoplazmā un uz apikālās plazmolemmas. Vidējs daudzums cilvēka defensīna 2 pozitīvo saistaudu šūnu bija koncentrēts ap asinsvadiem. Mezotēlijā novērojām daudz cilvēka defensīna beta 2 pozitīvo struktūru. Citotrofoblastā un sincītijtrofoblastā bija atsevišķas pozitīvās cilvēka defensīna beta 2 šūnas. Ekstraembrionālajā mezenhīmā bija vidēji daudz cilvēka defensīna beta 2 pozitīvo šūnu. Perifērajā trofoblastā tika novērots daudz cilvēka defensīna beta 2 pozitīvo struktūru.

Dzemes grūtniecības augšanas faktori, receptori, cilvēka defensīns beta 2, apoptoze

Transformējošais augšanas faktors beta 1: vidēju TGF beta 1 pozitīvo šūnu daudzumu novērojām grāvīda endometrija epitēlijā un gļotādas saistaudos. TGF beta 1 pozitīvās šūnas perēkļveidā bija koncentrētas epitēlijā. Gļotādas saistaudos atklājām vidēji daudz TGF beta 1 pozitīvo struktūru: TGF beta 1 pozitīvie makrofāgi un neitrofilie leikocīti perēkļveidā bija koncentrējušies ap asinsvadiem. Perifērajā trofoblastā konstatējām daudz TGF beta 1 pozitīvo šūnu.

Bāziskais fibroblastu augšanas faktors un tā receptors 1: dzemes grūtniecības gadījumā gan epitēlijā, gan gludajā muskulatūrā tika konstatēts daudz FGFR1 pozitīvo šūnu. Asinsvadu sienīņu šūnās un nervu šķiedrās bija

vidēji daudz FGFR1 pozitīvo struktūru. Tikai atsevišķi makrofāgi un neitrofile leukocīti ekspresēja FGFR1.

Endometrija epitēlijā un *lamina propria* bija atrodams vidējs daudzums bFGF pozitīvo struktūru. Ekstraembrionālā mezenhīma saturēja daudz FGFR1 pozitīvo šūnu, sincītijtrofoblāsts un citotrofoblāsts – vidēju daudzumu, bet bFGF minētajās struktūrās netika konstatēts. Perifērajā trofoblāstā varēja konstatēt vidēju daudzumu bFGF un daudz FGFR1 pozitīvo struktūru.

Bāziskais nervu augšanas faktors un tā receptors p75: dzemdes grūtniecības gadījumā *decidua basalis* tika novērots daudz bāziskā NGF pozitīvo epiteliocītu. Konstatējām arī daudz NGF pozitīvo struktūru atlobenes kompaktajā slānī, arī makrofāgos un leukocītos. Vidēji daudz nervu šķiedru, bet maz asinsvadu šūnu uz savas plazmolemmas ekspresēja NGF. Perifērajā trofoblāstā bija daudz, bet – sincītijtrofoblāstā vidējs daudzums NGF saturošo struktūru. Maz NGF pozitīvo struktūru tika konstatēts ekstraembrionālajā mezenhīmā. Citotrofoblāstā NGF pozitīvās struktūras netika konstatētas.

Insulīnam līdzīgais augšanas faktors 1 un tā receptors: dzemdes epitēlijā konstatējām daudz gan IGF-1, gan IGF-1R pozitīvo struktūru. Gludajā muskulatūrā, kā arī uz endoteliocītu un nervu šķiedru plazmolemmas ne IGF-1, ne IGF-1R netika konstatēts. Vidējs daudzums šūnu perifērajā trofoblāstā, citotrofoblāstā un sincītijtrofoblāstā uzrādīja IGF-1. Daudz IGF-1R pozitīvo šūnu konstatējām perifērajā trofoblāstā, bet citotrofoblāstā un sincītijtrofoblāstā novērojām vidēju daudzumu IGF-1R pozitīvo struktūru. Ekstraembrionālajā mezenhīmā redzējām maz IGF-1 un IGF-1R pozitīvo struktūru. Gļotādas saistaudos IGF-1 uzrādīja atsevišķas šūnas, bet vidējs daudzums šūnu bija IGF-1R pozitīvās.

Hepatocītu augšanas faktors: HGF vidējā daudzumā tika konstatēts endometrija epitēlijā. Negatīvu HGF reakciju novērojām nervu šķiedrās, endoteliocīti un miocīti arī bija HGF negatīvi. Endometrija *lamina propria*

konstatējām daudz HGF pozitīvo struktūru. Ekstraembrionālā mezenhīma, sincītijtrofoblats, citotrofoblats, perifērais trofoblats arī uzrādīja daudz HGF pozitīvo struktūru.

Dzemes grūtniecības invāzija: proteīngēni 9.5: konstatējām mazu PGP 9.5 pozitīvo šūnu daudzumu endometrija epitēlijā. Endoteliocītos un miocītos PGP 9.5 netika konstatēts. Citotrofoblats, sincītijtrofoblats un ekstraembrionālā mezenhīma arī nesaturēja PGP 9.5. Bazālās atlobenes nervu šķiedras bagātīgi ekspresēja PGP 9.5. Perifērajā trofoblastā un endometrija kompaktajā slānī novērojām vidēju daudzumu PGP 9.5 pozitīvo šūnu.

Dzemes grūtniecības programmētā šūnu nāve: gravidā endometrijā konstatējām daudz apoptotisko struktūru. Apoptotiskais indekss olvada epitēlijā bija 74%. Atlobenes stromā tika novērots daudz apoptotisko miocītu un endoteliocītu. Daudzas perifērā trofoblasta un horija bārkstīņu šūnas uzrādīja apoptozi.

Dzemes grūtniecības antimikrobās aizsardzības olbaltumvielas: daudz cilvēka defensīna beta 2 pozitīvo struktūru konstatējām endometrija epitēlijā. Daudz saistaudu šūnu, t.i., makrofāgu un neitrofilo leikocītu, arī bija cilvēka defensīna beta 2 pozitīvās. Tādas šūnas īpaši bija koncentrētas ap asinsvadiem. Citotrofoblastā, sincītijtrofoblastā un perifērajā trofoblastā tika konstatēts vidējs daudzums cilvēka defensīna beta 2 pozitīvo struktūru. Ekstraembrionālā mezenhīma arī uzrādīja vidēju daudzumu cilvēka defensīna beta 2 pozitīvo šūnu.

Augšanas faktori un to receptori, neuropeptīdi, CK, cilvēka defensīns beta 2, apoptoze embriju audos

Transformējošais augšanas faktors beta 1: embrija audos konstatējām daudz TGF beta 1 pozitīvo šūnu, īpaši epitēlijos, nierēs un plaušās. TGF beta 1 lokalizējās apikāli epiteliālo šūnu citoplazmā. Daudz TGF beta 1 pozitīvo struktūru bija arī sklerogēnajā mezenhīmā, asinsvados, vidējs to daudzums – muskuļos un uz nervu šķiedru plazmolemmas.

TGF beta 1 pozitīvās šūnas difūzi atradām miokardā un perikardā. Skrimšļa pārkaulošanās un proliferācijas zonās tika novērots vidēji daudz, bet perihondrā – daudz TGF beta 1 pozitīvo struktūru. Ekstraembrionālā mezenhīma uzrādīja daudz TGF beta 1 pozitīvo struktūru. Nervu caurulītē, spinālajos ganglijos un CNS apvalkos lokalizējās atsevišķas TGF beta 1 pozitīvās šūnas.

Bāziskais fibroblastu augšanas faktors un tā receptors 1: daudz FGFR1 pozitīvo struktūru tika konstatēts embrija audos – orgānu epitēlijos, sklerogēnajā mezenhīmā, perihondrā un skrimšļa proliferācijas zonā, bet vidējs daudzums – hordas paliekās. Tomēr hondrocīti uzrādīja gan FGFR1, gan bFGF negatīvu reakciju.

Pleiras un perikarda mezotēlijs, miokards, spinālie gangliji, muskuļšķiedru, nervu šķiedru plazmolemmas un endoteliocīti saturēja vidēju daudzumu FGFR1 pozitīvo struktūru. Epitēlijos, endotēlijā, skrimšļa pārkaulošanās centros un perihondrā arī tika atrastas bFGF pozitīvās struktūras, bet vidējā daudzumā. Embrija sklerogēnā mezenhīma, muskuļšķiedras, nervu šķiedras, spinālie gangliji, CNS apvalki, kā arī hordas paliekas parādīja mazu bFGF pozitīvo struktūru daudzumu.

Bāziskais nervu augšanas faktors un tā receptors p75: daudz vai vidēji daudz pozitīvo struktūru tika novērots praktiski visos embrija audos.

Vidējs daudzums NGF pozitīvo šūnu bija sklerogēnajā mezenhīmā, perihondrā un CNS apvalkos, kā arī spinālajos ganglijos. Vidēji daudz muskuļšķiedru un asinsvadu šūnu plazmatiskās membrānas arī saturēja minēto faktoru. Daudz embrija nervu šķiedru bija NGF pozitīvās. Tomēr NGF pozitīvās struktūras netika konstatētas hordas paliekā skrimšļa proliferācijas zonās, hondrocītos un pārkaulošanās centros.

Daudz NGFRp75 pozitīvo struktūru novērojām nervu šķiedru, muskuļšķiedru un endoteliocītu plazmatiskajās membrānās. Spinālajos ganglijos un ekstraembrionālajā mezenhīmā redzējām vidēju daudzumu NGFRp75 pozitīvo šūnu. Embrija epitēlijos un topošajā skeletā NGFRp75 pozitīvās struktūras netika konstatētas.

Insulīnam līdzīgais augšanas faktors 1 un tā receptors: daudz IGF-1 un IGF-1R pozitīvo struktūru bija atrodams embrija respiratorajā un gremošanas sistēmā, nierēs un ādas epitēlijā. Gan IGF-1, gan IGF-1R pozitīvo struktūru vidēju daudzumu varēja redzēt endotēlijā un muskuļšķiedrās. Daudz IGF-1 un IGF-1R pozitīvo šūnu pērkļveidā lokalizējās embrija aknās. Sklerogēnā mezenhīma, perihondrs un pārkaulošanās centri uzrādīja vidēju IGF-1 un IGF-1R pozitīvo šūnu daudzumu.

Hepatocītu augšanas faktors: embrija audiem – gan epitēlijam un mezenhīmai, gan nervu sistēmas elementiem bija raksturīga bagātīga HGF sadale. Embriji saturēja daudz HGF pozitīvo endoteliocītu, muskuļšķiedru un nervu šķiedru. Perihondrs un embrija iekšējo orgānu kapsulas arī uzrādīja daudz HGF pozitīvo šūnu.

Embrija ādas, kuņģa un zarnu trakta, respiratorās sistēmas un nieru tubuļu epitēliji saturēja vidēju HGF pozitīvo šūnu daudzumu. Arī aknu parenhīmā lokalizējās vidējs daudzums HGF pozitīvo šūnu.

Tādā pašā daudzumā HGF bija atrodams spinālajos ganglijos un CNS apvalkos, kā arī ekstraembrionālajā mezenhīmā. HGF vienīgi netika konstatēts

topošā skeleta struktūrā, respektīvi, skrimšļa proliferācijas zonās, hondrocītos, pārkaulošanās centros un hordas paliekās.

Inervācija un CNS attīstība:

Sinaptofizīns: embriju audos konstatējām atšķirīgu GFAP, PGP 9.5, sinaptofizīna un hromogranīnu A un B pozitīvo struktūru relatīvu daudzumu.

Vidēju daudzumu sinaptofozīnu saturošo šūnu novērojām spinālajos ganglijos un embriju saistaudos ap asinsvadiem. Nervu šķiedras un muskuļu šķiedras uz savas plazmatiskās membrānas arī ekspresēja sinaptofizīnu. Embriju epitēlijos, saistaudos, muskulatūrā, perihondrā, skrimšļa proliferācijas zonās, pašā skrimslī un pārkaulošanās centros neredzējām sinaptofizīnu saturošas šūnas.

Hromogranīni A un B: vidēju hromogranīnu A un B pozitīvo šūnu daudzumu novērojām tikai embrija spinālajos ganglijos. Hromogranīnu A un B granulas tika konstatētas embrija ganglionāro šūnu citoplazmā.

Glijas fibrilārais skābais proteīns: daudz GFAP saturošo nervu šķiedru konstatējām embriju audos. GFAP pozitīvās šūnas bija lokalizētas arī spinālajos ganglijos un nervu caurulītes endimālajā un apmetņa slānī, tās bija redzamas arī motorajos neironos. Nervu šķiedras un endotelioctīti arī uzrādīja GFAP imūnreaktivitāti. Asinsvados bija atrodams vidējs daudzums GFAP pozitīvo šūnu. Embriju epitēliji, saistaudi, muskulatūra un skeleta elementi bija GFAP negatīvi.

Proteīngēniela 9.5: embrija audos novērojām daudz PGP 9.5 saturošo nervu šķiedru. CNS apvalkos un spinālajos ganglijos redzējām vidēju daudzumu PGP 9.5 pozitīvo struktūru. Atsevišķas šūnas embrija aknās, nierēs un plaušās arī ekspresēja PGP 9.5.

Citokeratīni 5 un 13 embrija audos: embriju ādas epitēlijs visos slāņos uzrādīja daudz gan CK 5, gan CK 13 pozitīvo šūnu. Maz CK 5 un CK 13 pozitīvo šūnu redzējām asinsvadu sienā. Embrija skrimšļa pārkaulošanās centros bija lokalizētas gan CK 5, gan CK 13 pozitīvās šūnas.

Mezenhīmu ietekmējošo gēnu ekspresija embriju audos: embrija epitēliji, asinsvadu sienu šūnas, muskuļšķiedras un nervu šķiedras uzrādīja gan Msx2, gan BARX1 gēnu produktu saturošas struktūras.

BARX1 bija atrodams muguras smadzeņu motorajos neironos un spinālā ganglija pseidounipolārajos neironos. Serozie apvalki, t.i., pleira un perikards, arī uzrādīja vidēju daudzumu BARX1 pozitīvo struktūru. Daudz BARX1 pozitīvo šūnu tika konstatēti miokardā.

BARX1 gēna produkts bagātīgi bija atrodams sklerogēnajā mezenhīmā, perihondrā un skrimšļa proliferācijas zonās. Daudz Msx2 gēnu produkta ekspresēja hondrocīti un skrimšļa proliferācijas zonas šūnas, bet maz – perihondra šūnas.

Vidējs Msx2 un mazs BARX1 pozitīvo šūnu daudzums lokalizējās ekstraembrionālajā mezoderumā.

Programmētā šūnu nāve jeb apoptoze embriju audos: apoptoze tika atrasta praktiski visos embrija audos. Apoptotiskais indekss ādā, nierēs, gremošanas traktā un respiratorajā epitēlijā bija 78%. Vidējs apoptotisko šūnu daudzums tika konstatēts embrija aknās un iekšējo orgānu diferencējošā mezenhīmā, CNS apvalkos, perihondrā un pārkaulošanās centros. Ekstraembrionālā mezenhīma uzrādīja vidēju apoptotisko šūnu daudzumu.

Embrija epitēlijos bija atrodams vidējs daudzums kaspāzes 6 pozitīvo šūnu: ādā, plaušās, nierēs un gremošanas traktā. Sklerogēnā mezenhīma, kā arī embrionālie iekšējo orgānu saistaudi un perihondrs saturēja lielu vai vidēju daudzumu kaspāzes 6 pozitīvo šūnu.

Apoptozi neatradām skrimšļa proliferācijas zonā un hialīnā skrimšļa hondrocītos.

Antimikrobās aizsardzības olbaltumvielas embriju audos: vidēju cilvēka defensīna beta 2 pozitīvo šūnu daudzumu atradām embrija ādas epitēlijā. Vidēju cilvēka defensīna beta 2 pozitīvo struktūru daudzumu konstatējām embrija respiratorās sistēmas, gremošanas trakta un nieru epitēlijā.

Embrija aknās ap centrālām vēnām novērots vidējs daudzums perēkļveidā lokalizētu cilvēka defensīna beta 2 pozitīvo šūnu.

Vidējs daudzums pozitīvo šūnu tika atrasts sklerogēnajā mezenhīmā, perihondrā un atsevišķas šūnas – orgānu stromā. Ekstraembrionālā mezenhīma arī ekspresēja šo antimikrobās aizsardzības olbaltumvielu.

Statistiskā datu analīze

Divu neatkarīgu grupu salīdzināšanai, lietojot rangu skalas lielumus, tika izmantots Manna–Vitnija (*Mann–Whitney*) tests. Rezultāti tika uzskatīti par ticamiem, ja $p < 0,05$.

Statistiski ticamu atšķirību konstatējam bFGF un FGFR1, IGF-1 un IGF-1R, NGF un NGFRp75, kā arī TGF beta 1 faktoru un receptoru sadalē implantācijas audos.

FGFR1 dominēja pār bFGF gan fizioloģiskas dzemdes ($p=0,011$), gan olvada grūtniecības ($p=0,008$) gadījumā.

Olvada grūtniecības gadījumā salīdzinājumā ar dzemdes grūtniecību IGF-1R praktiski nav atrodams audos ($p=0,026$). **IGF-1R bija statistiski ticami vairāk konstatējams audos dzemdes grūtniecības gadījumā nekā IGF-1R olvada grūtniecības gadījumā ($p=0,017$).**

Olvada grūtniecības gadījumā TGF beta 1 nebija konstatējams, bet dzemdes grūtniecības gadījumā tika konstatēta TGF beta 1 atradne endometrijā ($p=0,049$).

NGF dominēja pār NGFRp75 gan fizioloģiskas dzemdes ($p=0,011$), gan olvada grūtniecības ($p=0,001$) gadījumā.

Spīrmana korelācijas koeficients (rho) parādīja, ka pētāmajos audos novērojama vidēji vai vāji pozitīva vai negatīva korelācija starp atsevišķiem faktoriem un receptoriem.

Dzemdies fizioloģiskas grūtniecības gadījumā novēroja **vāju negatīvu korelāciju** starp FGFR1 un NGF epitēlijā ($\rho = -0,23$), FGFR1 epitēlijā un PGP 9.5 endotēlijā ($\rho = -0,15$), kā arī FGFR1 perifērajā trofoblastā un TGF beta 1 perifērajā trofoblastā ($\rho = -0,23$), FGFR1 saistaudu šūnās un bFGF saistaudu šūnās ($\rho = -0,26$).

Atlobenes audos tika konstatēta **vāji pozitīva korelācija** starp FGFR1 un NGF saistaudu šūnās ($\rho = 0,21$), kā arī starp FGFR1 un NGF nervu šķiedrās ($\rho = 0,39$).

Vidēji negatīvu korelāciju konstatējām endometrija audos starp FGFR1 un bFGF epitēlijā ($\rho = -0,56$), FGFR1 un HGF epitēlijā ($\rho = -0,37$), FGFR1 un HGF saistaudu šūnās ($\rho = -0,42$), kā arī FGFR1 un PGP 9.5 nervu šķiedrās ($\rho = -0,4$).

Olvada grūtniecības gadījumā tika konstatēta **vāji negatīva korelācija** starp FGFR1 un NGF epitēlijā ($\rho = -0,22$), FGFR1 un bFGF saistaudu šūnās ($\rho = -0,21$).

Olvada audos novēroja **vāji pozitīvu korelāciju** starp FGFR1 un bFGF muskuļšķiedrās ($\rho = 0,19$), FGFR1 un IGF-1 perifērajā trofoblastā ($\rho = 0,16$), FGFR1 un PGP 9.5 perifērajā trofoblastā ($\rho = 0,22$), FGFR1 un IGF-1 saistaudu šūnās ($\rho = 0,21$).

Negatīva vidējā korelācija olvada grūtniecības gadījumā tika konstatēta FGFR1 un HGF epitēlijā ($\rho = -0,58$), FGFR1 un HGF nervu šķiedrās ($\rho = -0,48$), FGFR1 un PGP 9.5 nervu šķiedrās ($\rho = -0,425$).

Pozitīvu vidēju korelāciju olvada audos novēroja starp FGFR1 un NGF perifērajā trofoblastā ($\rho = 0,49$).

Kraskela–Vollisa (*Kruskal-Wallis*) tests uzrādīja statistiski ticamu savstarpējo sakarību starp implantācijas vietu (*decidua* vai olvads) un

- bFGF epitēlijā ($p < 0,0001$)
- IGF-1R epitēlijā ($p < 0,0001$)
- IGF-1R citotrofoblastā ($p < 0,0001$)
- IGF-1R saistaudu šūnās ($p < 0,0001$)
- IGF-1 perifērajā trofoblastā ($p < 0,0001$)
- TGF beta 1 perifērajā trofoblastā ($p < 0,0001$)
- HGF ekstraembrionālajā mezenhīmā ($p < 0,0001$)
- HGF saistaudu šūnās ($p < 0,0001$)
- NGF epitēlijā ($p < 0,0001$)
- NGF muskuļšķiedrās ($p < 0,0001$)
- NGF endotēlijā ($p < 0,0001$)
- NGF saistaudu šūnās ($p < 0,0001$)
- NGF nervu šķiedrās ($p < 0,0001$)
- Cilvēka defensīnu beta 2 citotrofoblastā ($p < 0,0001$)
- Cilvēka defensīnu beta 2 sincītijtrofoblastā ($p < 0,0001$)
- Cilvēka defensīnu beta 2 perifērajā trofoblastā ($p < 0,0001$)
- Cilvēka defensīnu beta 2 saistaudu šūnās ($p < 0,0001$)
- PGP 9.5 epitēlijā ($p < 0,0001$)
- PGP 9.5 perifērajā trofoblastā ($p < 0,0001$)

DISKUSIJA

Pētījuma populācija un olvada grūtniecības riska faktori

Savā aprakstošajā pētījumā esam iekļāvuši divas pacienšu grupas:

- 1) pacientes ar fizioloģisku dzemdes grūtniecību un
- 2) pacientes ar olvada grūtniecību.

Pēc *Kamwendo* datiem, ektopiska grūtniecība visbiežāk konstatējama sievietēm 30 gadu vecumā (*Kamwendo et al.*, 2000). Pacienšu vecums abās grupās bija praktiski vienāds – 29,7 gadi 2. grupā, bet 30,8 gadi 1. grupā ($p=0,62$). Grūtniecības laiks dzemdes grūtniecības grupas pacientēm bija 6,05 gestācijas nedēļas, bet olvada grūtniecības grupas pacientēm – 6,7 gestācijas nedēļas ($p=0,21$).

IIS ir pierādīts olvada grūtniecības riska faktors (*Varma and Gupta*, 2009). Mūsu pētījumā IIS vidējais epizožu skaits pacientēm ar spontānu fizioloģisku grūtniecību bija 0,3 (tikai 3 no 10), bet olvada grūtniecības grupā 0,7 (10 no 17; trim pacientēm bija atkārtoti gadījumi), tomēr statistiski ticamas atšķirības starp grupām nebija ($p=0,062$). Tas arī ir izskaidrojams ar nelielo atlasī. Olvada grūtniecības grupā netika novērota statistiski ticama starpība starp pacientēm ar IIS un bez IIS anamnēzē.

Saslimtība ar IIS tieši korelē ar STS saslimtību, proti, hlamīdiju un gonorejas infekciju (*Haggerty et al.*, 2010). Tikai vienai pacientei no abām grupām bija dokumentēta STS, proti, hlamīdijas infekcija. *Chlamydia trachomatis* incidence Eiropas Savienībā variē no 1,7 līdz 17% (*Fenton et al.*, 2004).

Tā kā saslimtība ar IIS ir tieši atkarīga no STS izplatības un seksuālās uzvedības, mēs pacientēm fiksējām arī partneru skaitu. IIS risks pieaug, ja sievietei pēdējo 30 dienu laikā ir bijis vairāk nekā viens dzimumpartneris

(*Jossens et al.*, 1996) vai vairāk nekā četri dzimumpartneri sievietes dzīvē (*Wolner-Hanssen et al.*, 1990). Dzemdes grūtniecības grupas pacientēm vidēji bija 2,66 partneri, bet olvada grūtniecības grupas pacientēm – 2,75, kas nav statistiski ticama atšķirība ($p=0,9$).

Abu grupu pacientes neizmantoja nekādas kontracepcijas metodes, izņēmums bija viena olvada grūtniecības grupas paciente, kura lietoja IUS divus gadus, lai bloķētu ovulāciju un izsargātos gan no nevēlamas, gan ektopiskas grūtniecības. Jāatzīmē, ka IUS padara neiespējamu blastocistas implantāciju dzemdē gandrīz par 99% (*Kaneshiro et al.*, 2010), bet neietekmē ovulāciju, apaugļošanos un ektopisku ieligzdošanos. IUS, kā parādīja *Xiong* meta analīze, nav ne olvada grūtniecības, nedz rupturētas olvada grūtniecības riska faktors (*Xiong et al.*, 1995).

Pārtrauktā grūtniecība bija kārtējā grūtniecība katrai pacientei ar fizioloģisku grūtniecību (vidēji 4,2 grūtniecība), bet divām pacientēm ar olvada grūtniecību tā bija pirmā grūtniecība (vidēji 2,4 grūtniecība). Arī abortu skaits lielāks bija dzemdes grūtniecības grupā – 2,4, bet otrajā grupā – 0,94 ($p=0,004$). Kopumā dzemdes grūtniecības grupas pacientēm bija mazāk reproduktīvu problēmu (grūtniecības un abortu skaits anamnezē) nekā olvada grūtniecības grupas pacientēm ($p=0,047$). Tas liecina par olvada grūtniecības grupas pacienšu sākotnēju predispozīciju uz reproduktīvajām problēmām.

Pierādīts, ka ektopiskas grūtniecības riska faktors ir smēķēšana (*Farquar*, 2005), bet saskaņā ar mūsu pētījuma datiem vairāk smēķēja pacientes ar nevēlamu grūtniecību ($n=7$) nekā pacientes ar olvada grūtniecību ($n=3$; $p=0,013$). Kaut gan mūsu dati nesakrīt ar literatūras datiem, šis fakts ir izskaidrojams ar, iespējams, zemāku sociālo un izglītības līmeni pacientēm (*Pedersen et al.*, 2006), kuras izvēlas nevēlamās grūtniecības pārtraukšanu, un nelielu objektu skaitu abās atlasēs.

Mūsu pētījuma mērķis nebija olvada grūtniecības epidemioloģiskā analīze. Mēs varam secināt, ka statistiski ticamu rādītāju atšķirību, izņemot

grūtniecības un abortu skaitu, starp abām pacienšu grupām nebija. Šis fakts ir nozīmīgs, jo, analizējot pētījuma gaitā trīs audu grupās iegūtos datus, mēs uzskatījām, ka ir svarīgi konstatēt iespējamās atšķirības un asociētās patoloģijas, kas varēja ietekmēt morfoloģisko ainu dzemdes, ektopiskas grūtniecības un embrija audos.

Augšanas faktori, to receptori dzemdes un olvada implantācijas gadījumā

TGF beta 1 ir būtiska loma dzimumsistēmas funkcionēšanā (*Godkin et al.*, 1998; *Jones et al.*, 2006), respektīvi, faktors piedalās endometrija remodelēšanā (*Stoikos et al.*, 2008) un trofoblasta invāzijā (*Lyll et al.*, 2001; *Simpson et al.*, 2002). Periimplantācijas fāzē TGF beta 1 atrodams gan uz *conceptus*, gan uz endometrija virsmas (*Gupta et al.*, 1996; 1998a; 1998b), šis faktors regulē endometrija transformāciju un *conceptus* adhēziju pie endometrija virsmas (*Massuto et al.*, 2010) un trofoblasta invāziju endometrijā (*Geisert et al.*, 1982; *Bazer et al.*, 1987).

Pētāmajos dzemdes grūtniecības audos TGF beta 1 bija plaši izplatīts: epiteliocītu apikālajā citoplazmā un atsevišķu šūnu perifērajā trofoblastā, makrofāgos un neitrofilajos leukocītos. Mūsu atradne liecina par šī faktora nozīmi endometrija transformācijā implantācijas vietā.

Zhao cilvēka olvadā konstatēja visas TGF beta izoformas un secināja, ka faktori aktīvi piedalās olvada funkciju nodrošināšanā (*Zhao et al.*, 1994). Periimplantācijas fāzē TGF beta 1 modulē olvada mikrovidi un kā autokrīnais vai parakrīnais faktors regulē embrija attīstību (*Arganaraz et al.*, 2010). *Sun* ar līdzautoriem pacientēm ar olvada neauglības faktoru novēroja palielinātu TGF beta 1 imūnekspressiju saaugumu vietās un secināja, ka TGF beta 1 ietekmē saaugumu veidošanos olvadā (*Sun et al.*, 2009). Vēlāk šī autoru grupa pierādīja,

ka TGF beta 1 ekspresijas intensitāte negatīvi korelē ar grūtniecības iestāšanās iespēju sievietēm ar ķirurģisku olvada saaugumu korekciju neatkarīgi no saaugumu smaguma un sievietes vecuma (*Li et al., 2011*).

Mūsu pacientēm ar olvada grūtniecību pētījuma gaitā olvada audos TGF beta 1 pozitīvi nokrāsotas šūnas netika konstatētas. Ņemot vērā iepriekš aprakstītos faktus par TGF beta 1 lomu olvada funkcijā, varam apgalvot, ka ektopiska ieligzdošanās mūsu pacientēm nebija saistīta ar saauguma procesu olvadā. TGF beta 1 trūkums audos olvada grūtniecības gadījumā liecina arī par traucētu *conceptus* un mātes audu mijiedarbību, un līdz ar to organisma nespēju attīstīt ektopisku grūtniecību.

Cilvēka endometrijā neatkarīgi no menstruālā cikla, kā arī postmenopauzē, tiek ekspresēts bFGF (*Rusnati et al., 1990*). Grūtniecības laikā dzemdē novēro palielinātu estrogēnu atkarīgo bFGF ekspresiju (*Wordinger et al., 1994; Samathanam et al., 1998*). Endometrijā ekspresējas abi bFGF receptori – FGFR1 un FGFR2 (*Welter et al., 2004*). Edvards parādīja, ka bFGF un to receptoru implantācijas laikā atrod endometrija luminālajā, kriptu epitēlijā un stromā. Autors ar līdzstrādniekiem pierādīja, ka VEGF trūkuma gadījumā FGFR1 un FGFR2 ekspresija palielinās, lai bFGF inducētu angiogēnēzi, kas nepieciešama veiksmīgai implantācijai un placentācijai (*Edwards et al., 2011*).

Daudz FGFR1 pozitīvo struktūru mēs konstatējam praktiski visos olvada sienas apvalkos. Dzemdes grūtniecības gadījumā aina bija līdzīga, daudz FGFR1 pozitīvo šūnu novērojām gan epitēlijā, gan asinsvadu sienā, endoteliocītu, mezoteliocītu citolemmās un miocītu sarkolemmās. Atsevišķas bFGF pozitīvās šūnas atradam dzemdes epitēlijā un *decidua* saistaudos. Embrija audi, respektīvi, sincītijtrofoblāsts, citotrofoblāsts un ekstraembrionālā mezenhīma arī parādīja lielu daudzumu FGFR1, bet bFGF šajās struktūrās trūka.

Tātad gan dzemdes, gan ektopiskas grūtniecības gadījumā bFGF un FGFR1 izplatīti vienādi kā implantācijas vietā, tā trofoblāsta šūnās. Tas liecina

par faktora svarīgo lomu ne tikai angiogēnēzē, bet arī audu remodelēšanā. Mūsu pētījumā tika konstatēts, ka gan fizioloģiskas, gan patoloģiskas implantācijas gadījumā FGFR1 relatīvais daudzums dominē pār bFGF. Iespējams, ka FGFR relatīva daudzuma dominēšana pār bFGF ir saistīta ar blastocistas inducētu audu kompensatoru remodelēšanu gan dzemdes, gan olvada audos.

NGF piedalās vairākos reproduktīvos procesos, respektīvi, regulē tuklo šūnu aktivitāti implantācijas laukā (*Bose et al.*, 2009), olnīcā nosaka folikulocītu jutību pret gonadotropīniem, inducējot folikulu stimulējoša hormona (FSH) receptoru ekspresiju un estrogēnu sintēzi (*Salas et al.*, 2006). NGF ir nepieciešamais faktors grūtniecības progresēšanā, progesterons uztur NGF lokālo koncentrāciju dzemdē (*Shi et al.*, 2006).

Pētījuma gaitā ārpusdzemdes grūtniecības gadījumā tika novērots vidējs NGF pozitīvo struktūru daudzums olvada epitēlijā, gludajā muskulatūrā, endotēlijā un nervu šķiedrās. Gadījumā, kad blastocista implantējās dzemdē, imūnhistoķīmiskā aina bija līdzīga: *decidua basalis* epitēlijā tika novērots daudz NGF pozitīvu šūnu, perifērajā trofoblastā un atsevišķās kompaktā slāņa šūnās, arī makrofāgos un leukocītos.

Olvada *lamina propria* un muskuļapvalkā NGFRp75 saturēja tikai nervu šķiedras, kuras lokalizējās arī atlobenes stromā blastocistas implantācijas vietā. Statistiski ticamas faktora un receptora relatīva daudzuma atšķirības olvada un endometrija audos netika konstatētas.

Citu nervu un neuroendokrīno šūnu marķieri, t.i., PGP9.5, konstatējām olvada epitēlijā un nervu šķiedrās. Olvada epitēlijā lokalizējās PGP 9.5 pozitīvie neuroepitēliālie ķermenīši. Perifērā trofoblasta šūnas, kā arī atsevišķas šūnas olvada *lamina propria* arī ekspresēja PGP 9.5. Bazālās atlobenes epitēlijs, nervu šķiedras, perifērā trofoblasta un saistaudu šūnas uzrādīja PGP 9.5 pozitīvu reakciju. PGP 9.5 sadale un lokalizācija abos gadījumos bija vienāda.

Mūsu pētījumā patoloģiskas implantācijas gadījumā neizdevās konstatēt NGF, NGFRp75 un PGP 9.5 izmaiņas olvada sienā. Varam secināt, ka NGF, NGFRp75 un PGP 9.5 ir svarīgi faktori implantācijas vietā un tie nav saistīti ar nepareizu blactocistas ieligzdošanos.

Kapur parādīja, ka endometrija deciduālās šūnas ekspresē IGF-1 implantācijas vietā (*Kapur et al.*, 1992). Tas ir nepieciešams nosacījums embrija turpmākai implantācijai. Dzemdes epitēlijā mēs konstatējām vidēju daudzumu IGF-1 un lielu daudzumu IGF-1R pozitīvo struktūru. Statistiski ticamas atšķirības IGF-1 un IGF-1R sadalē *decidua* audos mēs neatradām, līdz ar to var secināt, ka gan pats faktors, gan receptors piedalās endometrija remodelēšanā, embrija implantācijā un trofoblasta invāzijā un nodrošina veiksmīgu grūtniecības attīstību.

Mūsu pētījumā tika konstatēts, ka IGF-1 ir bagātīgi izdalīts olvada epitēlijā, bet IGF-1R – tikai perēkļveidā izplatīts šūnu apikālajā virsmā. Konstatētais IGF-1R trūkums olvada grūtniecības gadījumā liecina par šūnu proliferācijas traucējumiem, trofoblasta invāzijas ierobežojumu audos, kuros notiek patoloģiska implantācija. Līdz ar to tādi embrija attīstības pamatprocesi kā angiogēnēze, trofoblasta invāzija un šūnu augšana ir traucēta. Iespējams IGF-1R trūkums ektopiskas implantācijas skartajos audos ir organisma kompensatorās adaptācijas mehānisms, kas norobežo patoloģisko procesu.

HGF piedalās endometrija cikliskajā remodelēšanā pelēm, regulējot šūnu proliferāciju estrogēnu un progesterona ietekmē (*Zhang*, 2010). Cilvēka endometrija audos estrogēni arī regulē fibroblastu HGF sintēzi. Tas varētu būt saistīts ar endometriozes un vēža attīstību (*Coleman et al.*, 2009; *Felix et al.*, 2010). HGF ir plaši atrodams sievietes reproduktīvā trakta šķīdumos, arī olvada (*Srivastava et al.*, 1999) sekretā. Implantācijas laikā HGF regulē trofoblasta migrāciju (*Rajaraman et al.*, 2010) un invāziju (*Kauma et al.*, 1999).

Ektopiskas grūtniecības gadījumā mūsu pacientēm olvada epitēlijs, asinsvadu sieniņu šūnas, perifērā trofoblasta šūnas, kā arī horija bārkstiņu šūnas

bagātīgi ekspresēja HGF. Endometrija epitēlijā HGF sadalījās vidēji lielā daudzumā, bet ekstraembrionālajai mezenhīmai, sincītijtrofoblastam, citotrofoblastam, perifērajam trofoblastam un saistaudu šūnām bija raksturīga intensīva faktora ekspresija pareizās implantācijas vietā. HGF vienādi sadalījās gan olvada, gan endometrija audos un nebija saistīts ar patoloģisku blastocistas implantāciju.

MMP 2 ir viens no svarīgākajiem trofoblasta invāzijas regulētājiem cilvēka audos grūtniecības agrīnajā laikā. *Seval* uzskata, ka MMP 2 ir primārais mediators, kas nosaka trofoblasta invāziju deciduālajā endometrijā, remodelēšanu un angiogēnēzi (*Seval et al.*, 2004). Trofoblasta šūnas ekspresē MMP 9 gan *in vitro*, gan *in vivo* (*Peters et al.*, 1999). MMP 9 aktivizācija ir nepieciešama ārpusšūnu matricē olbaltumvielu šķelšanai blastocistas invāzijas procesā (*Martinez-Hernandez et al.*, 2011).

Mēs konstatējam daudz MMP 2 un MMP 9 pozitīvo šūnu olvada un horija bārkstiņu audos, līdz ar to secinām, kā olvada grūtniecības gadījumā no MMP 2 un MMP 9 atkarīgā trofoblasta invāzija nebija traucēta un MMP 2, kā arī MMP 9 disfunkcija nebija saistīta ar ektoģisku ieligzdošanos.

Programmētā šūnu nāve implantācijas vietā

Sievietes reproduktīvajā sistēmā apoptoze nosaka cikliskas izmaiņas endometrijā. Programmētā šūnu nāve biežāk notiek dzeltenā ķermeņa fāzē, tā ir atkarīga no progesterona un estrogēna (*Otsuki*, 2001; *Sengupta et al.*, 2003).

Olvada apoptotisko šūnu skaits arī ir mainīgs un, kā parāda pētījumi, palielinās pēc ovulācijas virzienā uz olvada savienojumu ar dzemdi, tātad ir saistīts ar olšūnas nobriešanu un apaugļošanu (*Urhausen et al.*, 2011). *Assisi* arī uzskata, ka apoptotiskā aktivitāte palielinās pēc ovulācijas un nosaka

dinamiskas izmaiņas olvadā, kā arī audu remodelēšanu reproduktīvā cikla laikā (*Assisi et al.*, 2011).

Izmantojot vienu no iespējamām metodēm apoptozes noteikšanai – *TUNEL*, mēs konstatējām, ka pacientēm gravidajā endometrijā un horija bārkstīņu audos parādās praktiski visu šūnu (totāla) apoptoze. Arī olvada audiem bija raksturīga izteikta apoptoze gan epitēlijā (apoptotiskais indekss olvada epitēlijā bija 75%), gan gļotādas saistaudos. Mēs uzskatām, kā šī atradne ir saistīta ar aktīvu audu pārbūvi, kas ir saistīta ar blastocistas implantāciju. Statistiski ticamas atšķirības apoptozes atradnē olvada un dzemdes grūtniecības gadījumā nekonstatējām.

Antimikrobās aizsardzības olbaltumvielas implantācijas vietā

Antimikrobās aizsardzības olbaltumvielas mēs analizējām, identificējot cilvēka defensīnu beta 2 pētāmajos audos. *Das* pierādīja, ka endometrija stromas neitrofilie leukocīti izdala cilvēka alfa un beta defensīnus, kas neietekmē embrija implantāciju dzemdē (*Das et al.*, 2007). *Hu* konstatēja, ka pacientēm ar un bez saaugumiem olvadā cilvēka defensīnu beta 2 apikālajā virsmā satur olvada epiteliocīti (*Hu et al.*, 2010).

Mūsu pētījumā cilvēka defensīnu beta 2 bagātīgi izdalīja gan olvada grūtniecības, gan dzemdes grūtniecības audi. Cilvēka defensīna beta 2 sadale endometrija un olvada audos nebija statistiski ticami atšķirīga.

Analizējot cilvēka defensīna beta 2 relatīvu daudzumu, ieguvām rezultātus, kas liecina par šīs antimikrobās olbaltumvielas piedalīšanos gan patoloģiskas, gan fizioloģiskas implantācijas procesā.

Augšanas faktori un to receptori embrija audos

Embriogēnēzē TGF beta 1 kontrolē šūnu proliferāciju, diferenciaciju, migrāciju un apoptozi (*Yang et al.*, 2003), nosaka epitēlija un mezenhīmas mijiedarbību gan prenatali, gan postnatāli (*Zavadil and Boettinger*, 2005), kā arī topošā skeleta formas (*Hall and Miyake*, 2001). TGF beta 1 ir plaši atrodama embrija audos 4.–6. gestācijas nedēļā (*Kukanova and Pilmane*, 2007).

Embrija audos mēs novērojām plaši izteiktu TGF beta 1 imūnreaktivitāti. Ir pierādīts, ka TGF beta 1 ietekmē epiteliālas šūnas ekspresē tradicionālus mezenhimālus marķierus un otrādi (*Chai et al.*, 2010), embriogēnēzē atspoguļojot šūnu diferenciacijas procesu. Iespējams, tāda faktora izplatība epiteliālajos un mezenhimālajos embrija audos liecina, ka TGF beta 1 aktīvi piedalās pirmā trimestra organogēnēzē.

Arī bFGF1, kuru uzskata par mezenhimālas izcelsmes šūnu marķieri pieauguša cilvēka audos (*Chai et al.*, 2010), bija plaši izplatīts embrija audos. Fibroblastu augšanas faktoru saimes aktivitāte agrīnajā embriogēnēzē nosaka mezenhīmas diferenciaciju, migrāciju un pozitīvi vai negatīvi regulē svarīgo blastocistas gēnu ekspresiju (*Hardy et al.*, 2011). Embrija audos tika konstatēts daudz FGFR1 un vidēji daudz bFGF pozitīvo struktūru. Mēs uzskatām, ka bFGF un FGFR1 regulē endodermālās, ektodermālās un mezodermālās izcelsmes šūnu diferenciaciju embriogēnēzē un ir divi no plašāk atrodamiem augšanas faktoriem cilvēka embriogēnēzē.

Mēs NGF pozitīvās struktūras lielā vai vidējā daudzumā novērojām praktiski visos embrija audos, izņemot skrimšļa proliferācijas zonas, hondrocītus un pārkaulošanās centrus. NGFRp75 bagātīgi iekrāsoja nervu šķiedru, muskuļšķiedru un endoteliocītu plazmatiskās membrānas. NGF nodrošina cilvēka embrija šūnu izdzīvošanu, un tā klātbūtne ir nepieciešams faktors blastocistas implantācijai, turpmākai attīstībai un grūtniecības progresēšanai līdz bērna piedzimšanai (*Tometten et al.*, 2005; *Toti et al.*, 2006).

Reproduktīvajā fizioloģijā pašreiz īpaša vieta ir veltīta IGF-1 un tā receptora pētījumiem. Mātes IGF-1 stimulē augļa augšanu, aktivizējot barības vielu transplacentāro transportēšanu (*Iwashita, 1994*). Augļa intrauterīnās augšanas aiztures gadījumā novēro kompensatoru IGF-1 koncentrācijas pieaugumu (*Holmes et al., 1999; Ozkan et al., 2008a*) placentas audos. *Kamei* eksperimentu sērijā ar zivju embrijiem noskaidroja, ka IGF-1 mijiedarbība ar receptoru, pastāvot hipoksijai, notiek divējādi: mazinās IGF-1R ekspresija, un aktīvāka kļūst insulīnam līdzīgā faktora saistošā proteīna sintēze (*Kamei et al., 2011*).

Gēnu pētījumi parāda, ka IGF-1 līdzdalība nepieciešama embrija attīstībā. Peļu embrijiem ar IGF-1, IGF-2, un IGF-1R nulles gēniem (*Liu et al., 1993*) un cilvēka embrijiem ar dabīgām IGF-1, IGF-2 un IGF-1R mutācijām izdzīvošana nav iespējama smago attīstības anomāliju dēļ (*Klammt et al., 2008*).

Mēs konstatējam IGF-1 un IGF-1R pozitīvās šūnas praktiski visos embrija orgānos, kurus ieguvām pēc spontānas fizioloģiskas grūtniecības pārtraukšanas. *Brogiolo* uzskata, ka IGF-1 iedarbība uz mērķa šūnām ir izšķiroša embrija augšanai un attīstībai (*Brogiolo et al., 2001*). Šī mijiedarbība starp faktoru un receptoru ir evolucionāra regulatora sistēma, kas sāk darboties ļoti agrīni un nosaka embrija izdzīvošanu. Mūsu dati par IGF-1 un IGF-1R atradni 5–12 gestācijas nedēļu veciem embrijiem arī liecina par faktora un receptora nozīmi organoģenēzē. Tas sakrīt ar citu autoru datiem (*Schlueter et al., 2007; Le Rotin, 2008*).

Embriogēneses procesā mezenhimocīti producē HGF, kas kā morfogēnais faktors piedalās organoģenēzē (*Barros et al., 1995; Ohmichi et al., 1998*). HGF ekspresija mezodermā regulē šūnu migrāciju dermatomiosklerotomā un nosaka ķermeņa formu (*Kawashima-Ohya et al., 2011*). Savā pētījumā embrija audos gan epitēlijā, gan mezenhīmā, gan nervu sistēmas elementos novērojām daudz HGF pozitīvo struktūru. Mūsu atradne

lieciena par HGF svarīgu nozīmi turpmākajā embrionālajā attīstībā, sākot no 5./6. embrionālās attīstības nedēļas.

Inervācija un centrālās nervu sistēmas attīstība

Sinaptofizīns piedalās kalcija transportā, neurotransmisijā, neironu un to izaugumu augšanā. Neuropeptīds ir noteicošais faktors neirālo saikņu dibināšanā starp CNS un PNS agrīnajā embriogēnēzē (*Wiedenmann and Franke, 1985; Buffa et al., 1986; Gould et al., 1986*). Dotajā darbā mēs identificējam daudz sinaptofizīna pozitīvo šūnu embrija nervu sistēmā, kā arī daudz spinālajos ganglijos un atsevišķās šūnās embrija saistaudos ap asinsvadiem.

Hromogranīni kontrolē sekretoru granulu bioģenēzi un ir atrodami visās neuroendokrīnajās šūnās (*Larsson et al., 1992; Tischler, 2002; Hendy et al., 2006*). Embriogēnēzē šos prohormonus sastop virsnieres serdē, gremošanas sistēmā un aizkuņģa dziedzerī – audos, kuros ir bagātīgi izplatītas neuroendokrīnās šūnas (*Kent and Coupland, 1989; Mahata et al., 1993; Totzauer et al., 1995; Kameda et al., 1998*).

Mūsu pētījumā 5–12 nedēļu veciem cilvēka embrijiem hromogranīnu A un B saturošas granulas tika novērotas embrija ganglionāro šūnu citoplazmā, pārsvarā spinālajos ganglijos. Mēs uzskatām, ka šī atradne liecina par citu neuropeptīdu (sinaptofizīns) sintēzi gangliocītos.

Embriogēnēzē GFAP regulē neiroglijas diferenciāciju un migrāciju, bet postnatālajā periodā ir astrocītu marķieris. Neironi, neiroglija un endodermas glija attīstās no kopīgas priekšteču šūnas, kurai raksturīga GFAP ekspresija (*Morest and Silver, 2003; McDermott et al., 2005*).

Mēs konstatējam, ka GFAP pozitīvās šūnas lokalizējas spinālajos ganglijos un nervu caurulītes endodermālajā un apmetņa slānī, kā arī motorajos

neironos. Visdrīzāk šīs GFAP pozitīvās šūnas, kuras lokalizējas nervu caurulītes endimālajā un apmetņa slānī, uzrāda GFAP iesaistīšanu nervu šūnu diferenciācijā, migrācijā un reģionalizācijā.

Citokeratīni 5 un 13 embrija audos

CK 5 un skābais CK 14 kopā atrodami daudzkārtaino plakano epitēliju bazālajā slānī (*Lersch and Fuchs, 1988; Casatorres et al., 1994*). Šīs šūnas ir virsējo slāņu priekšteču šūnas, respektīvi, mazdiferencētie keratinocīti (*Byrne et al., 1994; Fuchs, 2007*).

CK 13 uzskata par nepārragota epitēlija marķieri (*Gao and Mackenzie, 1992*), bet ir zināms, ka tā nav vienīgā CK 13 funkcija. *Olson* konstatēja, ka cilvēka endometrija epitēlija luminālās šūnas sekretorajā fāzē un truša endometrija epitēlija luminālās šūnas periimplantācijas fāzē ekspresē CK 13 (*Olson et al., 2002*).

Mūsu analizētajos preparātos embrija daudzkārtainie epitēliji ekspresēja CK 5 un CK 13. Tas varētu nozīmēt, ka CK 5 un CK 13 var būt nenobriedušo keratinocītu un daudzkārtaino epiteliocītu marķieri vai, iespējams, CK 5 un CK 13 ekspresija ir raksturīga visiem mazdiferencētiem epiteliocītiem. Līdz ar to tradicionālos uzskatus par CK audu specifiskumu nevar pilnībā apstiprināt.

Mezenhīmu ietekmējošo gēnu ekspresija embrija audos

BARX1 gēns regulē kraniofaciālās ektomezenhīmas, kuņģa un kaula attīstību (*Tissier-Seta et al., 1995; Tucker et al., 1998*). BARX1 gēna produkts bagātīgi sadalījās embriju audos mūsu petījumā.

Msx2 gēns kodē DNS saistošo proteīnu, kas modulē transkripcijas aktivitāti (*Takahashi et al.*, 1996) un veicina šūnu augšanu (*Davidson*, 1995). Mēs novērojām Msx2 gēna produktu dažādos mezodermlāas izcelsmes orgānos: plaušās, sirdī, sklerogēnajā mezenhīmā, muskuļskiedrās, asinsvadu sienā, serozajos apvalkos. Embrija mutes dobuma, mēles un siekalu dziedzeru epitēliji, kuri ir ektodermlāas izcelsmes epitēliji, arī uzrādīja Msx2 pozitīvās šūnas. Tas ir izskaidrojams ar faktu, ka ektodermas derivātu attīstībai ir nepieciešama zemāk esošas mezenhīmas indukcija, bet Msx2 nodrošina šo indukciju. Arī citi autori uzskata Msx2 par epiteliālas–mezenhīmas inducējošas mijiedarbības regulētāju, atrod to gan transkripcijas, gan gēna produktu siekalu dziedzeros (*Jaskoll et al.*, 1998).

BARX1 un Msx2 gēnu produkti ir transkripcijas faktori, kuriem ir integratīva nozīme embrija audos. Tie nodrošina ne tikai mezenhīmo orgānu attīstību, bet arī regulē ektodermlāas izcelsmes šūnu diferenciaciju, jo padara iespējamu molekulāru mijiedarbību starp dīgļlapām (*Kukanova and Pilmane*, 2007).

Programmētā šūnu nāve embrija audos

Embriogēnēzē apoptoze nodrošina šūnu populācijas un diferenciacijas līniju regulāciju. Apoptotisko šūnu noteikšanai cilvēka blastocistas un embrija audos zinātnieki piedāvā izmantot *TUNEL* metodi (*Gavreli et al.*, 1992; *Byrne et al.*, 1999). Mūsu darba rezultāti parāda, ka apoptotiskās šūnas plaši atrodamas 5–12 nedēļu veciem cilvēka embrijiem.

Mēs nevaram apgalvot, ka šāda plaša šūnu apoptoze ir atrodama *in vivo* un nav saistīta ar pašu grūtniecības pārtraukšanas manipulācijas ietekmi uz embrija šūnām. Iespējams, kā apoptoze embriogēnēzē ir fizioloģisks process,

kas risinās paralēli šūnu diferenciācijai un norobežo mazdiferencēto šūnu izplatību un skaitu audos līdz ģenētiski determinētajam.

Programmētās šūnu nāves izpildītājas – proteāzes kaspāzes 6 relatīvais daudzums sakrīt ar *TUNEL* metodē noteikto apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu embriju audos. Mūsu dati liecina par programmētās šūnu nāves piedalīšanos embrionālajā attīstībā – implantācijā un organoģenezē. Tā tiek realizēta, aktivizējot kaspāzi 6.

Antimikrobās aizsardzības olbaltumvielas embrija audos

Antimikrobā aizsardzības olbaltumvielas pasargā ne tikai māti, bet arī augli. To realizē cilvēka defensīni – antimikrobo olbaltumvielu grupa. *Vento* konstatēja, ka defensīni atrodami neiznēsāto jaundzimušo bronhiālajā šķidrumā, un secināja, ka iedzimta antimikrobās aizsardzības sistēma darbojas, pirms auglis ir nobriedis postnatālajai dzīvei (*Vento et al.*, 2010).

Mūsu pētījumā tika konstatēta plaši izplatīta un bagātīga cilvēka defensīna beta 2 klātbūtne embrija audos. Mēs uzskatām, ka iedzimtas antimikrobās aizsardzības mehānisms sāk darboties agrīni un jau 5./6. gestācijas nedēļā nodrošina embrija antibakteriālo aizsardzību.

Diskusijas sadaļas nobeigumā jāpieņem, ka, analizējot no 5./6. līdz 12. gestācijas nedēļai vecus cilvēka embrijus, kam vardarbīgi pārtrauca turpmāko attīstību, nevar kopumā izdarīt secinājumus par fizioloģiskiem procesiem, kas notiek *in vivo*. Lai rastu pilnu priekšstatu par augšanas faktoru un gēnu piedalīšanos prenatālajā cilvēka attīstības stadijā, nepieciešams paplašināt embriju un gestācijas laiku atlasu, salīdzināt rezultātus ar izmaiņām fetālajā periodā. Ētisku un morālu apsvērumu dēļ tāds pētījums fizioloģiskajos apstākļos veselīgiem cilvēka embrijiem gan *in vivo*, gan *in vitro* nav iespējams.

SECINĀJUMI

1. Olvada grūtniecības gadījumā blastocistas implantācijas vietā statistiski ticami trūkst IGF-1R (bet ne IGF-1), tas liecina par sievietes organismā noritošu kompensatorās adaptācijas mehānismu, kas norobežo patoloģisku procesu.
2. Gan spontānas fizioloģiskas, gan olvada grūtniecības gadījumā audos FGFR1 statistiski ticami dominē pār bFGF, iespējams, tas ir saistīts ar blastocistas inducētu audu remodelēšanu implantācijas vietā.
3. TGF beta 1 nav atrodams, bet FGFR1, bFGF, NGF, NGFRp75 PGP 9.5, HGF, cilvēka defensīns beta 2, MMP 9 un MMP 2 ir plaši izplatīti olvada audos ektopiskas grūtniecības gadījumā un piedalās ektopiskas grūtniecības morfopatoģenezē.
4. TGF beta 1, IGF-1, IGF-1R, bFGF, FGFR1, NGF, NGFRp75, HGF, PGP 9.5 ir plaši izplatīti endometrija audos grūtniecības gadījumā un piedalās embrija implantācijas procesā.
5. TGF beta 1, IGF-1, IGF-1R, bFGF, FGFR1, NGF, NGFRp75, HGF, PGP 9.5 ir plaši izplatīti embrija audos no 5./6. līdz 12. embrionālās attīstības nedēļai un piedalās organoģenezē.
6. Apoptoze ir plaši izplatīta gan ektopiskās un fizioloģiskās implantācijas vietā, gan embrija audos 5./6.–12. embrionālās attīstības nedēļā un ir saistīta ar aktīvu audu remodelēšanu.
7. Cilvēka defensīna beta 2 antimikrobās aizsardzība realizējas jau embrija organoģenezes stadijā 5./6. –12. embrionālās attīstības nedēļā.
8. BARX1 un Msx2 gēnu produkti ir plaši izplatīti embrija audos no 5./6. līdz 12. embrionālās attīstības nedēļai. Iespējams, tie nodrošina ne tikai mezenhimālo orgānu attīstību, bet arī regulē ektodermālas izcelsmes šūnu diferenciāciju.

9. GFAP ir mazdiferencēto nervu šūnu, gan glijas, gan neironu marķieris, sinaptofizīns nodrošina CNS kontaktu veidošanu, bet hromogranīns A un B ir saistīts ar citu neuropeptīdu (sinaptofizīns u.c.) veidošanās sākumu cilvēka dīglim 5./6.–12. embrionālās attīstības nedēļā.

10. Embrija daudzkārtainie epitēliji ekspresē CK 5 un CK 13 jau no 5./6. embrionālās attīstības nedēļas, liecinot par agrīnu epitēlijaudu fenotipēšanu.

PUBLIKĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU

Publikācijas – raksti

1. *Kukanova A., Pilmane M.* Distribution of Neuropeptides in Human Embryonic Central Nervous System. RSU zinātniskie raksti, 2006; 302 – 304
2. *Kukanova A., Pilmane M.* Distribution of Some Growth Factors and Appearance of Some Genes in Different Tissues of Human Embryo. RSU Collection of Scientific Papers, 2007; 21 – 24
3. *Kukanova A., Pilmane M., Rezeberga D.* Occurrence of growth factors and their receptors in tubal pregnancy – affected tissue. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, 2010; 64 (4): 20 – 30
4. *Miskova A., Pilmane M., Rezeberga D.* Augšanas faktoru un antimikrobās olbaltumvielu sadalījums dzemdes un olvada grūtniecības gadījumā. RSU zinātnisko rakstu krājums, 2010; 183–190
5. *Miskova A., Pilmane M., Rezeberga D.* Immunohistochemical distribution of IGF-1, bFGF and their receptors in decidual, embryonic and tubal human pregnancy tissue. In: Papers on Anthropology 2011, (20); 272–288

Publikācijas – tēzes Latvijā

1. *Kukanova A., Pilmane M., Rezeberga D.* Distribution of some Growth Factors and Genes in Different Tissue of Human Embryo. Rīgas Stradiņa Universitātes 6. zinātniskās konferences tēzes, 29.-30. marts, 2007: 71

2. *Kukanova A., Pilmane M., Rezeberga D.* Distribution of some Growth Factors and Genes in Different Tissue of Human Embryo. The abstract book of Baltic Morphology V, 19-20 November, Riga, Latvia, 2007: 43
3. *Kukanova A., Pilmane M., Rezeberga D.* Augšanas faktori un apoptoze olvada grūtniecības gadījumā". Rīgas Stradiņa Universitātes 7. zinātniskās konferences tēzes, 13.-14. marts, 2008: 60
4. *Kukanova A., Pilmane M., Rezeberga D.* Augšanas faktori olvada grūtniecības gadījumā. The abstract book of Baltic International Conference in Obstetrics and Gynecology and 5th Congress of Latvian Obstetricians and Gynecologists, 10-11 October, Riga, Latvia, 2008: 17. The best poster presentation award.
5. *Kukanova A., Pilmane M., Rezeberga D.* Cilvēka defensīna beta 2 sadalījums olvadu audos ārpusdzemdes grūtniecības gadījumā. Rīgas Stradiņa Universitātes 8. zinātniskās konferences tēzes, 2.-3. aprīlis, 2009: 71
6. *Kukanova A., Pilmane M., Rezeberga D.* Insulin like growth factor 1 and its receptor appearance in pregnancy associated tissue. 6. Latvijas Ārstu kongresa tēzes, 19.-21. jūnijs, 2009: 46
7. *Kukanova A., Pilmane M., Rezeberga D.* IGF-1, bFGF, TGF beta 1 and their receptors in different cases of embryo implantation. Rīgas Stradiņa Universitātes 9. zinātniskās konferences tēzes, 18.-19. marts, 2010: 77
8. *Miskova A., Pilmane M., Rezeberga D.* FGFR1 un bFGF sadalījums cilvēka embrija un grūtniecības audos. Rīgas Stradiņa Universitātes 10. zinātniskās konferences tēzes, 14.-15. aprīlis, 2011: 74
9. *Miskova A., Pilmane M., Rezeberga D.* NGF and NGFRp75 appearance in embryo tubal and uterine implantation. The abstract book of 6th Congress of Latvian Obstetricians and Gynecologists and the 4th RCOG Eurovision Conference, 13.-15. October, Riga, Latvia, 2011: 85

Publikācijas – tēzes ārzemes

- 1 *Kukanova A., Pilmane M., Rezeberga D.* Факторы роста TGF beta 1, NGF, bFGF, IGF-1 и их рецепторы в случае трубной беременности. Проблемы репродукции, 2009; 241 – 242
- 2 *Kukanova A., Pilmane M., Rezeberga D.* Human defensin beta 2 distribution in pregnancy associated tissue. The abstract book of Baltic Morphology V, 27-28 August, Kaunas Lithuania, 2009: 10
- 3 *Kukanova A., Pilmane M., Rezeberga D.* Distribution of growth factors and their receptors in tubal pregnancy affected tissue. Journal of Perinatal Medicine, 2009; 37: 806-807
- 4 *Kukanova A., Pilmane M., Rezeberga D.* NGF, NGFRp75 and PGP9.5 immunoreactivity in tubal pregnancy tissue. Early Pregnancy Winter Course. Early pregnancy standarts, protocols and guidelines, 10-11 december, Rotterdam, Netherland, 2010; 239-240
- 5 *Kukanova A., Pilmane M., Rezeberga D.* IGF-1 appearance in embryo tubal and uterine implantation. The abstract book of 6th International Conference on the Female Reproductive Tract, 20-23 May, Frauenchiemsee, Germany 2011: 13
- 6 *Miskova A., Pilmane M., Rezeberga D.* FGFR1 and bFGF appearance in human embryo and pregnancy tissue. Human Reproduction, 2011; 26 (1): i214
- 7 *Miskova A., Pilmane M., Rezeberga D.* Immunohistochemical distribution of IGF-1, bFGF and their receptors in decidual, embryonic and tubal human pregnancy tissue. The abstract book of Baltic Morphology VI, 22-23 September Tartu, Estonia, 2011: 73

PETĪJUMA APROBĀCIJA

1. 2007. gads 30. marts – standareferāts RSU 6. zinātniskā konference „*Distribution of some Growth Factors and Genes in Different Tissue of Human Embryo*”
2. 2007. gada 13. jūnijs – diploms par II. vietu RSU XX Rezidentu zinātniski praktiskajā konferencē „Aktualitātes medicīnā” ar darbu „*Distribution of Neuropeptides in Human Embryonic Central Nervous System*”.
3. 2007. gada 19.–20. novembris – stenda referāts *Baltic Morphology 4th Scientific conference* „*Distribution of some Growth Factors and Genes in Different Tissue of Human Embryo*”. Rīga, Latvija.
4. 2008. gada 13. marts – stenda referāts Rīgas Stradiņa Universitātes 7. zinātniskajā konferencē „Augšanas faktori un apoptoze olvada grūtniecības gadījumā”.
5. 2008. gada 11. oktobris – 1. vieta *Baltic International Conference in Obstetrics and Gynecology and 5th Congress of Latvian Obstetricians and Gynecologists* par stenda referātu „Augšanas faktori olvada grūtniecības gadījumā” Rīga, Latvija.
6. 2009. gada 19.–22. janvāris – mutiskā uzstāšanās ar darbu „*TGF beta 1, NGF, bFGF, IGF-1 and their receptors in patients with tubal pregnancy*” uz *Third International Congress on Reproductive Medicine* Maskavā, Krievijā.
7. 2009. gada 2.–3. aprīlis – mutiskā uzstāšanās Rīgas Stradiņa Universitātes 8. zinātniskajā konferencē „Cilvēka defensīna beta 2 sadalījums olvadu audos ārpusdzemdes grūtniecības gadījumā”.
8. 2009. gada 19.–21. jūnijs – stenda referāts 6. Latvijas Ārstu kongresā „*Insulin like growth factor 1 and its receptor appearance in pregnancy associated tissue*”.

9. 2009. gada 27.–28. augusts – mutiskā uzstāšanās ar darbu „*Human defensine beta 2 distribution in pregnancy associated tissue*” uz *The 5th biannual Scientific Conference „Baltic Morphology 2009”*. Kauņā, Lietuvā.
10. 2009. gada 24.–28. oktobris – stenda referāts “*Distribution of growth factors and their receptors in tubal pregnancy affected tissue*” uz *9th World Congress of Perinatal Medicine* Berlīnē, Vācijā.
11. 2009. gada 10.–11. decembris – mutiskā uzstāšanās ar darbu “*NGF, NGFR75 and PGP 9.5 immunoreactivity in tubal pregnancy tissue*” uz *ESHRE Campus Symposium Early Pregnancy Winter Course* Roterdamā, Nīderlandē.
12. 2010. gada 18.–19. marts – mutiskā uzstāšanās ar darbu „*IGF-1, bfgf, TGF beta 1 and their receptors in different cases of embryo implantation*” Rīgas Stradiņa Universitātes 9. zinātniskajā konferencē .
13. 2010. gada 9. jūnijā – II godalgota vieta rezidentu XIII zinātniski – praktiskajā konferencē un konkursā ar darbu „Augšanas faktoru un antimikrobu olbaltumvielu sadalījums dzemdes un olvada grūtniecības gadījumā”.
14. 2011. gada 14.–15. aprīlis – mutiskā uzstāšanās Rīgas Stradiņa Universitātes 10. zinātniskajā konferencē ar darbu „FGFR1 un bFGF sadalījums cilvēka embrija un grūtniecības audos”.
15. 2011. gada 20.–23. maijs – stenda referāts „*IGF-1 appearance in embryo tubal and uterine implantation*” uz *6th International Conference on the Female Reproductive Tract* Frauenčiemzē, Vācijā.
16. 2011. gada 3.–6. jūlijs – stenda referāts „*FGFR1 and bfgf appearance in human embryo and pregnancy tissue*” uz *The 27th Annual Meeting of EHSRE* Stokholmā, Zviedrijā.
17. 2011. gada 20.–24. septembris – stenda referāts „*Immunohistochemical distribution of IGF-1, bFGF and their receptors in decidual, embryonic and tubal human pregnancy tissue*” uz *Conferences Baltic Morphology VI* Tartu, Igaunijā.

18. 2011. gada 14.–15. oktobris – stenda referāts „*NGF and NGFRp75 appearance in embryo tubal and uterine implantation*” uz *6th Congress of Latvian Obstetricians and Gynecologists and the 4th RCOG Eurovision Conference*. Rīga, Latvija.

PATEICĪBAS

- Izsaku sirsnīgo pateicību mana darba vadītājai *Dr. med., Dr. habil. med.*, profesorei Mārai Pilmanei par darba vadīšanu, pacietību, ieteikumiem un atbalstu jebkurā laikā.
- Izsaku pateicību mana darba vadītājai *Dr. med.* asociētai profesorei Dacei Rezebergai par palīdzību un atbalstu darbā.
- Pateicos darba recenzentiem *Dr. med.*, asociētai profesorei Ilzei Štrumfai, RSU; *Dr. vet. med.*, asociētai profesorei Ilzei Matīsei-Van Houtanai, LLU VMF; *Dr. med.*, Kristiina Rull, Tartu universitāte (Igaunija)
- Paldies AAI Morfoloģijas laboratorijas laborantei Natālijai Morozai par praktisko palīdzību reakciju veikšanā.
- Liels paldies maniem kolēģiem par atbalstu un ieteikumiem.
- Sirsnīgs paldies manai jaukai ģimenei par pacietību, atbalstu un doto man iespēju mierīgi strādāt ar promocijas darbu.