

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO  
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR  
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

**MAGISTRO DARBAS**

**NEVAISINGŲ MOTERŲ FOLIKULINIO SKYSČIO  
LĄSTELINĖS SUDĖTIES IR INTERFERONO- $\gamma$  KONCENTRACIJOS  
TYRIMAS**

Magistrantė NATALIJA DRAPEKO

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo vadovė:

med.dr. Audronė Eidukaitė

\_\_\_\_\_  
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir  
laboratorinės medicinos katedros vedėja

habil. dr., prof. Z. Kučinskienė leidžiama ginti

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_

Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

2006

## TURINYS

TEKSTE NAUDOJAMI LIETUVIŠKI IR TARPTAUTINIAI SUTRUMPINIMAI.....	4
1. ĮVADAS.....	5
1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai.....	6
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
2.1. Moters reprodukcinė sistema: istoriniai aspektai.....	7
2.2. Moters reprodukcinės sistemos anatominė sandara.....	8
2.3. Moters reprodukcinės sistemos organų fiziologija.....	12
2.3. Moterų nevaisingumas. Pagrindinės priežastys.....	15
2.4. Folikulinio skysčio fizinės, cheminės savybės, ląstelinė sudėtis.....	18
2.5. Leukocitų populiacijos randamos moters reprodukcinės sistemos audiniuose. Leukocitų vaidmuo moters reprodukcinėje sistemoje.....	18
2.6. Leukocitų išskiriami citokinai ir jų vaidmuo moters reprodukcinėje sistemoje.....	24
2.7. Interferono- $\gamma$ vaidmuo moters reprodukcinėje sistemoje.....	27
3. TIRIAMOJI DALIS.....	28
3.1. Tyrimo medžiaga. Tiriamoji grupė.....	28
3.2. Tiriamosios medžiagos surinkimas.....	28
3.3. Tyrimo metodai:.....	29
3.3.1. Leukocitų skaičiaus nustatymas.....	29
3.3.2. Leukocitų populiacijų nustatymas.....	30
3.3.3. Interferono- $\gamma$ nustatymas imunof fermentiniu metodu.....	32
3.3.4. Statistinė duomenų analizė.....	33
4. DARBO REZULTATAI.....	33
4.1. Nevaisingų moterų folikulinio skysčio leukocitų skaičius.....	33

4.2.Nevaisingų moterų folikulinio skysčio leukocitų populiacijos.....	34
4.3.Interferono- $\gamma$ koncentracija nevaisingų moterų folikuliniame skystyje.....	38
5.REZULTATŲ APTARIMAS.....	39
6.IŠVADOS.....	45
SUMMARY.....	47
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	48

## TEKSTE NAUDOJAMI LIETUVIŠKI IR TARPTAUTINIAI SUTRUMPINIMAI

APLC- nuo antikūnų priklausomas ląstelių citotoksiškumas.

CD (angl. *cluster of differentiation*)- leukocitų diferenciacijos antigenai.

CRB- C reaktyvusis baltymas.

Fc (angl. *fragment crystallizable*)- antikūno molekulės fragmentas.

FcR (angl. *fragment crystallizable receptor*)- receptorius antikūno Fc fragmentui.

FSH (angl. *folliculi stimulating hormon*)-folikulus stimuliuojantis hormonas.

GM-CSF (angl. *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*)- granulocitų ir monocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius.

hCC (angl. *human chorionic gonadotropin*)- žmogaus chorioninis gonadotropinas.

HLA (angl. *human leucocyte antigen*)- žmogaus leukocitų antigenas, ŽLA.

Ig- imunoglobulinas.

IL-interleukinas.

IVF (angl. *in vitro fertilization*)- dirbtinis apvaisinimas mėgintuvėlyje

ICSI (angl. *intracytoplazmic injection of spermatozooids*)- intracitoplazminė spermatozoido injekcija

TNF- $\alpha$  (angl. *tumor necrosis factor-alpha*)-  $\alpha$  -navikų nekrozės faktorius.

INF- $\gamma$  - interferonas- $\gamma$ .

MSB- manozę surišantis baltymas.

PG- prostaglandinas.

## 1.ĮVADAS

Moters reprodukcinės sistemos funkcijas: kiaušidžių vystymąsi, kiaušialąsčių brendimą, apvaisinimą ir implantaciją bei menstruacinio ciklo reguliavimą, aktyviai reguliuoja imuninės sistemos veiksniai. Vietiniai ląsteliniai bei humoraliniai veiksniai dalyvauja moters lytinių organų apsaugoje prieš virusus ir mikroorganizmus [31,16,13,28].

Leukocitai – pagrindiniai vietiniai kiaušidžių funkcijų modulatoriai, veikiantys per sekrecijos reguliavimo faktorius [31].

Leukocitų išskiriami citokinai dalyvauja spermatogenezėje ir gametogenezėje [9,2,6,10,31,28].

Pakankamas leukocitų skaičius moters urogenitalinės sistemos audiniuose, taip pat ir folikuliniame skystyje užtikrina normalią fiziologinę reprodukcinės sistemos veiklą, užkertama kelią infekciniam procesui, kurį gali sukelti per išorinius lytinius takus patekę mikroorganizmai[23].

Pastarųjų metų mokslo atradimai keičia požiūrį į nevaisingumą sukeliančias priežastis. Imuninės sistemos pokyčiai gali būti moters reprodukcinės sistemos ligų etiologijos ir patogenezės veiksniais. Manoma, kad folikulinio skysčio ląstelinės sudėties pakitimai gali dalyvauti moters sutrikusio vaisingumo patogenezėje[23].

Kaip įrodo tyrimai, svarbų vaidmenį vaisiaus išnešiojime vaidina imuninės sistemos ląstelės, kurios infiltravusios decidualinį audinį[46].

Yra duomenų, kad ląstelių aktyvavimo ir diferenciacijos sutrikimai, citokinų produkcijos pakitimai, turi įtakos akušerinės ir perinatalinės patologijos etiologijai[46].

Moters reprodukcinės sistemos leukocitų išskiriami citokinai veikia pleotropiškai į įvairiausias ląsteles, pagrinde, dalyvaudami apsauginių organizmo funkcijų sukūrimo ir vykdyme. Vietiškai tai pasireiškia formuojant tipišką uždegiminę reakciją, kurios metu sintetinami įvairūs citokinai, kurie veikia praktiškai visas ląsteles, kurios dalyvauja uždegiminėje reakcijoje: granulocitus, makrofagus, fibroblastus, endotelio ir epitelio ląsteles, o vėliau T ir B limfocitus. Imuninės sistemos ribose citokinai vykdo ryšį tarp nespecifinių apsauginių reakcijų ir specifinio imuniteto, veikdami abiem kryptim. Esant nepakankamai vietiniai apsauginiai reakcijai, citokinai patenka į cirkuliaciją. Tuomet jų poveikis pasireiškia

sistemiškai organizmo lygyje. Citokinai gali veikti praktiškai visus organus ir sistemas, dalyvauja homeostazės palaikyme. Organizme citokinai yra tarpininkai tarp imuninės, nervų, endokrininės, kraujodaros ir kitomis sistemomis. Jie tarnauja ryšininkais tarp šių sistemų, įtraukdami jas į organizavimą ir reguliavimą vieningos apsauginės reakcijos, jie formuoja ir reguliuoja visą kompleksą patofiziologinių pokyčių, atsirandančių patekus į organizmą patogeniui.

Remiantis šiais duomenimis savo darbe siekiame nustatyti ir įvertinti leukocitų skaičių esantį nevaisingų moterų folikuliniame skystyje, išaiškinti jų populiacijas ir pateikti jas procentine išraiška. Taip pat nustatyti interferono-  $\gamma$  koncentraciją nevaisingų moterų folikuliniame skystyje. Atlikus šiuos darbus, duomenys statistiškai apdoroti t- testu.

### **1.1.Darbo tikslas ir uždaviniai**

#### **Darbo tikslas:**

Nustatyti ir įvertinti leukocitų populiacijas ir interferono-  $\gamma$  koncentraciją nevaisingų moterų folikuliniame skystyje.

#### **Uždaviniai:**

- 1) Nustatyti ir įvertinti nevaisingų moterų folikulinio skysčio leukocitų kiekį.
- 2) Įvertinti nevaisingų moterų folikulinio skysčio leukocitų populiacijas.
- 3) Nustatyti ir įvertinti interferono-  $\gamma$  koncentraciją folikuliniame skystyje.

## 2. LITERATŪROS APŽVALGA

### 2.1. Moters reprodukcinė sistema: istoriniai aspektai

Moters reprodukcinė sistema ir su ja susiję reiškiniai nuo neatmenamos senovės kurstė žmonių žingeidumą. Nuo pirmykštės bendruomenės laikų žmonija kaupė patirtį susijusią su moters fiziologija, giminės pratęsimu. Tobulindamas įrankius, žmogus tobulėjo. Pirmosios žinios apie anatominę reprodukcinės sistemos sandarą, greičiausiai, atsirado prisijaukinus gyvulius ir ėmus juos skersti [23].

Senovės Egipto civilizacija sukaupė daugybę stebėjimais paremtų faktų, jie aprašyti papirusuose, kuriuose galima perskaityti, kaip sukelti menstruacijas, pataisyti pakrypusios gimdos padėtį. Ginekologijos temos gvildenamos ir kinų rankraščiuose, Babilono bibliotekos keraminėse plokštelėse, indų knygoje „Ajurveda“ [23,14].

Hipokratas ( 460-377 pr.m.e. ) veikale „Apie moterų ligas“ aprašo gimdos patologiją, makšties uždegimą, rekomenduoja chirurgines intervencijas.

XVI – XVII a. pasirodė garsių anatomų A.Vezalijaus ( *A. Vesalius*, 1514-1564 ), G. Felopijaus ( *G. Fallopius*, 1523-1562 ), K. Bartolinio ( *K. Bartholinus*, 1655-1738 ), R. Grato ( *R. Graat*, 1641-1673 ) darbai apie moters organizmo sandaros ypatybes [23]. Vezalijus pirmasis teisingai aprašė gimdos sandarą [23,14]. Gabrielius Felopijus nuodugniai aprašė kiaušintakius [23].

Levenhukui atradus mikroskopą, atsirado galimybė detaliau ištirti moters reprodukcinės sistemos audinių sandarą, ėmė ryškėti atskirų šio trakto dalių funkcijos [23].

1773 m. popiežiui laikinai panaikinus jėzuitų ordiną ir Edukacinei komisijai reorganizavus akademiją į Lietuvos Didžiosios Kunigaikštystės Vyriausiąją mokyklą, 1781 m. buvo atidaryta Medicinos kolegija. Joje „praktinės cirulninkystės ir akušerijos“ profesoriumi buvo prancūzas M. Renje ( *M. Regnier*, 1723-1800 ), o po jo mirties teorinės chirurgijos ir akušerijos profesoriumi dirbo A. Matusevičius ( 1760-1816 ), pagerinęs šios disciplinos dėstymą iki Europos mokslininkų lygio [14].

Šiuo metu moters reprodukcinė sistema, jos funkcijos, paralelės su kitais mokslais vis dar yra dominantė, tyrinėjama sritis. Pastarųjų metų tyrinėjimai parodo, kad aktyvų vaidmenį, šalia neuroendokrininės sistemos, vaidina imuninė organizmo sistema, kurios funkcijų pagrindiniai vykdytojai – leukocitai, išskirdami citokinus, aktyviai dalyvauja gonadų funkcijų reguliavime [9,10,6,5,7,2,4].

## **2.2. Moters reprodukcinės sistemos anatominė sandara.**

Žmogaus lytinių liaukų užuomazgos atsiranda 5-tą embriono raidos savaitę tarp tarpinių inkstų ir žarnos pasaito nugarinėje celomo ertmės sienelėje. Iš pradžių lytinės liaukos nediferencijuotos, identiškos tiek moteriškųjų tiek vyriškųjų embrionų, ir tik apie 8-tą embriono savaitę, dalyvaujant endokrinės sistemos išskiriamais hormonams, išryškėja kiaušidžių struktūra [14].

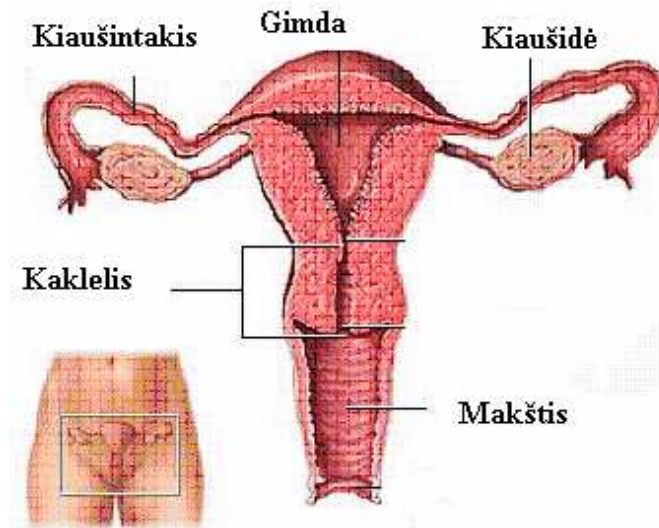
Iš moteriškųjų Miulerio latako (*ductus feminini*) viršutinių galų susidaro kiaušintakiai, iš apatinių susijungusių galų - gimda ir makštis [14].

Moteriškos lyties naujagimis dažniausiai yra su ryškiais, diferencijuotais pagal moteriškąjį fenotipą išoriniais lytiniais organais.

Moteriškieji lytiniai organai skirstomi į vidinius ir išorinius. Vidiniai lytiniai organai – tai lytinės liaukos, kuriose bręsta lytinės ląstelės ir gaminami lytiniai hormonai, bei lytiniai takai. Taigi, moters vidiniams lytiniais organams priklauso kiaušidės, kiaušintakiai, gimda ir makštis, o išoriniams – lytinės lūpos, varputė ir makšties prieangis [14].



## 1.Pav. Moters vidiniai lytiniai organai.



[Hans Frick, Benn Kummer, Reinhard Putz. Wolf – Heidegger's Atlas of Human Anatomy, 4th, 1990, 303].

Kiaušidė ( *ovarium* ) – tai porinė lytinė liauka. Išsidėsčiusi abėjuose gimdos pusėse. Kiaušidė yra ovalo formos, apie 3 cm ilgio, 10-15 g masės liauka. Ji yra mažajame dubenyje, prisiliejusi prie dubens sienelių. Vienas jos galas atsisukęs į gimdą, o kitas – į kiaušintakį. Nuo kiaušidės link gimdos ir dubens sienelės eina specialūs raiščiai, kurie palaiko kiaušidę tam tikroje padėtyje.

Kiaušidę dengia balzganasis dangalas. Viduje išsiraizgo kraujagyslės ir nervai – tai šerdinė kiaušidės dalis. Po balzganuoju dangalu yra žievinė dalis, kurioje formuojasi folikulai. Folikule yra moteriškoji lytinė ląstelė – kiaušialąstė (kiaušinėlis). Kiaušidėje yra gausybė pirminių (nesubrendusių) folikulų. Nuo lytinio brendimo pradžios veikiant hormonams folikulai pradeda bręsti. Naujagimės kiaušidėje yra apie 300 000-400 000 pirminių folikulų, per visą moters vaisingą laikotarpį iš jų tik 400-500 subręsta. Kiekvieną mėnesį visiškai subręsta dažniausiai tik vienas folikulas (jei tuo pačiu metu subręsta du ar daugiau folikulų, gali būti daugiavaisis nėštumas, t.y. gimsta dvynukai ar trynukai). Bręstantis folikulas keičia išvaizdą. Jį sudarančios ląstelės pradeda daugintis, folikulas didėja, jo viduje susidaro ertmė, kaupiasi skystis. Kartu bręsta ir kiaušinėlis. Folikulinės ląstelės pasižymi endokrine funkcija:

jos gamina lytinius hormonus (estrogenus). Subrendęs folikulas yra apie 1-2 cm skersmens, jį galima pamatyti echoskopu. Bręsdamas folikulas iš kiaušidės gilumos artėja prie kiaušidės paviršiaus ir ištempia jos balzganąjį dangalą. Neišlaikę spaudimo plyšta folikulo sienelė ir kiaušidės balzganasis dangalas, tuo metu folikulo skystis išteka į pilvaplėvės ertmę ir išplauna iš kiaušidės kiaušinėlių, kuris patenka į kiaušintakį. Šis procesas vadinamas ovuliacija. Ovuliacija dažniausiai įvyksta mėnesinių ciklo viduryje. Plyšus folikului, jo ląstelės pradeda daugintis ir užpildo buvusią ertmę. Šios ląstelės yra gelsvo atspalvio, todėl susidaręs naujas audinys vadinamas geltonkūniu. Geltonkūnio ląstelės taip pat gamina lytinius hormonus (progesteroną), kurie padeda vystyti nėštumui. Jei kiaušinėlis neapvaisinamas, geltonkūnis sunyksta, vietoj susiformuoja randinis audinys. Todėl po kiekvienų mėnesinių kiaušidė vis labiau randėja, mažėja ir raukšlėjasi. Šerdinę dalį sudaro jungiamasis audinys, kraujagyslės ir nervai[14,32,33].

Kiaušintakis ( *tuba uterina* ). – tai porinis organas, panašus į vamzdelį, lokalizuotas abėjuose gimdos dugno pusėse. Vienas jo galas atsiveria į gimdą, o kitas galas pasibaigia piltuvėlio formos išplatėjimu prie kiaušidės. Kiaušintakio ilgis yra apie 10-15 cm, skersmuo – 2-5 mm. Ties gimda kiaušintakio spindis yra siauresnis, o link piltuvėlio plėtėja. Piltuvėlio kraštai nelygūs, iškarpyti, sudaro spurgus. Vienas jų vadinamas kiaušidės spurgu, jis yra ilgiausias, nutįsta iki kiaušidės. Juo kiaušinėlis patenka iš kiaušidės į kiaušintakį. Kiaušintakį iš vidaus iškloja gleivinė, padengta virpamuoju epitelium (tai ląstelės, turinčios gaurelius, kurie juda gimdos kryptimi ir padeda slinkti kiaušinėliui). Raumeninis kiaušintakio dangalas taip pat padeda slinkti kiaušinėliui link gimdos. Paprastai kiaušinėlis juda kiaušintakiu 6-7 paras. Būtent kiaušintakyje ir įvyksta apvaisinimas, t.y. kiaušinėlis susilieja su atkeliavusia vyriškąja lytine ląstele – spermatozoidu. Jau apvaisintas kiaušinėlis patenka į gimdą, įsitvirtina jos sienelėje ir pradeda vystyti žmogaus embrionas. Jei kiaušinėlis neapvaisinamas, jis pašalinamas per mėnesines kartu su išskyromis. Kartais po lytinių organų uždegimų ar nutraukus nėštumą, susidaro sąaugos, kiaušintakių spindis gali užakti (tuomet moteris negali pastoti)[14, 32,33].

Gimda ( *uterus* ) — tai neporinis ertminis kriaušės formos organas. Gimda yra mažojo dubens centre, priekyje jos yra šlapimo pūslė, užpakalyje – tiesioji žarna, šonuose – kiaušintakiai ir kiaušidės. Gimdos raiščiai ( *lig.lata uteri*, *lig.teres uteri* ) fiksuoja gimdą tam tikroje padėtyje. Negimdžiusios moters gimdos ilgis apie 9 cm, svoris – 50 g. Gimdžiusios

moters matmenys ir svoris didesni. Skiriama viršutinės platesnė gimdos dalis, vadinama gimdos kūnu, ir apatinė siauresnė – gimdos kaklelis (jo ilgis yra apie 3 cm). Viršutinė plati gimdos kūno dalis vadinama gimdos dugnu, jo kampuose atsiveria kiaušintakiai. Gimdos viduje yra trikampio formos gimdos ertmė. Gimdos ertmė į apačią siaurėja ir pereina į gimdos kaklelio kanalą. Gimdos kaklelio apatinė dalis įeina į makštį, ši kaklelio dalis sudaryta iš priekinės ir užpakalinės lūpų, apsupančių gimdos kaklelio angą. Negimdžiusios moters ši anga yra apvali, o gimdžiusios – plyšio formos. Svarbi gimdos kūno ir kaklelio padėtis. Normaliai gimdos kūnas yra pakrypęs į priekį kaklelio atžvilgiu. Kartais gimdos kūnas būna kitoje padėtyje (pvz., pasviręs atgal), tuomet moteris gali nepastoti, nes spermatozoidai neprasisukverbia į gimdos ertmę. Gimdos sienelės storis yra 1,5-3 cm. Ją sudaro gleivinė, raumeninis ir serozinis (pilvaplėvės) dangalai. Gimdos gleivinė (endometras) yra labai stora (6-8 mm storio). Ji sudaryta iš dviejų sluoksnių – pamatinio ir funkcinio. Funkcinis gleivinės sluoksnis kiekvieno mėnesinių ciklo metu yra pašalinamas (kartu pašalinamas ir neapvaisintas kiaušinėlis). Vėliau šis sluoksnis atsistato iš pamatinio, išvešėja, išburksta ir pasiruošia priimti apvaisintą kiaušinėlių. Apvaisinimui neįvykus funkcinis sluoksnis pradeda nykti, plyšta kraujagyslės, prasideda kraujavimas – mėnesinės, ir ciklas prasideda iš naujo. Raumeninis dangalas (miometras) sudarytas iš trijų raumeninių skaidulų sluoksnių. Gimdos raumenys labai plastiški, tai svarbu nėštumo metu, kai gimdos ertmė padidėja 500 kartų. Tuomet labai sustorėja ir raumeninis dangalas. Jo susitraukimai labai svarbūs gimdant. Serozinis dangalas dengia gimdą iš visų pusių. Tarp gimdos ir šlapimo pūslės bei tarp gimdos ir tiesiosios žarnos serozinis (pilvaplėvės) dangalas sudaro ildubas, kuriose uždegimo metu gali kauptis pūliai. Apie gimdą gausu puraus jungiamojo audinio (vadinamo parametru), į kurį gali plisti uždegiminis procesas (tuomet vystosi grėsminga būklė – parametritas)[ 14, 32,33].

Makštis ( *vagina* ) – pailgo vamzdžio formos, 8 – 10 cm – tai neporinis apie 8-10 cm ilgio suploto vamzdelio formos organas, jungiantis gimdos kaklelį su lytiniu plyšiu. Makšties priekinė siena susiglaudžia su šlaple, o užpakalinė – su tiesiąja žarna. Makšties sienos yra susiglaudusios. Tarp gimdos kaklelio ir makšties sienų susidaro žiedinė kišenė – makšties skliautas. Makšties skliaute susikaupia patekusi sperma. Iš vidaus makštį iškloja gleivinė, kurią dengia daugiasluoksnis epitelis. Gleivinė sudaro žiedines raukšles. Gleivinėje gausu nervinių galūnelių. Raumeninis makšties dangalas yra storiusias, sudarytas iš išilginių ir

žiedinių raumeninių skaidulų. Per gimdymą makštis gali labai išsiplėsti. Normaliai makšties terpė yra silpnai rūgštinė (tai apsaugo nuo mikroorganizmų) [14,32,33].

Išoriniai lytiniai organai: lytinės lūpos, makšties prieangis, varputė. Lytinį plyšį apriboja dvi didžiosios lytinės lūpos. Tai priekyje ir užpakalyje besijungiančios odos raukšlės, kuriose gausu riebalinio audinio. Tarp didžiųjų lytinių lūpų yra mažosios lytinės lūpos. Tai taip pat odos raukšlės. Jų paviršiuje gausu liaukučių, gaminančių specifinį sekretą. Lytinių lūpų funkcija – apsauginė. Makšties prieangis yra tarp mažųjų lytinių lūpų. Čia atsiveria makštis ir šlaplė. Makšties prieangyje yra daug mažų liaukučių ir dvi didžiosios prieangio liaukos (Bartolinio liaukos), jos gamina specifinį sekretą. Varputė sudaryta iš akytkūnių, kurie analogiškai vyro varpos akytkūniams [14,32,33].

## **2.2. Moters reprodukcinės sistemos organų fiziologija.**

Moters lytinių organų fiziologija – tai dinamiški lytinių organų ląstelių, audinių ir visos lytinių organų sistemos kitimai, kurie priklauso nuo kitų organizmo sistemų veiklos. Svarbiausia normalių moters lytinių organų funkcija – reprodukcinė [14].

Šiai funkcijai realizuoti būtini nuoseklūs neuroendokrininiai, imuniniai pokyčiai [31]. Primatų ( ir žmonių ) lytinis elgesys nėra taip glaudžiai susijęs su ovuliacija, kaip kai kurių kitų rūšių. Moters lytinio ciklo metu periodiškai kinta kiaušidžių struktūra, lytinių hormonų koncentracija kraujyje ir gimdos gleivinė [32]. Moters lytinį ciklą kontroliuoja periodiškai išskiriami pagumburio gonadoliberinai ir hipofizės tropiniai hormonai – folitropinas bei liutropinas. Jie skatina folikulo augimą, brendimą, ovuliaciją ir geltonkūnio susidarymą [32,33]. Moters lytiniai organai ir visas organizmas kinta cikliška. Šie ciklai pasikartoja kiekvieną mėnesį ir yra vadinami mėnesinių (menstruacijų) ciklais. Juos labai griežtai reguliuoja hormonai [32].

Kiaušidės atlieka dvi pagrindines funkcijas: juose periodiškai bręsta lytinė ląstelė ir gaminami lytiniai hormonai [14,32,33].

Subrendusios moters kiaušidžių reguliarūs pokyčiai skirstomi į 3 fazes: folikulinę – folikulo plyšimo, ovuliacijos ir liuteininę – geltonkūnio formavimosi [14,32,33].

Folikulinė fazė. Veikiant folitropinui ( FSH ), kiaušidėse bręsta grupė folikulų. Iš jų dažniausiai vienas pasidaro vyraujančiu – greičiau bręsta, aktyviau sintetinami estrogenai. Folikule gausėja skysčio (*liquor folliculi*), kuris atskiria grūdėtąsias ląsteles: vienos nustumiamos vidinio apvaskalėlio sluoksnio link, kitos – prie kiaušinėlio (*ovulum*). Kol visiškai subręsta, lytinė ląstelė folikule esti prisišliejusi prie grūdėtųjų ląstelių iškilimo (*cumulus oophorus*). Subrendusią lytinę ląstelę gaubia skaidrusis dangalas (*zona pellucida*) ir spindulinis vainikas (*corona radiata*). Subrendusi lytinė ląstelė, atsiskyrusi nuo grūdėtųjų ląstelių, laisvai juda folikulo skystyje. Subrendęs folikulas artėja prie kiaušidės paviršiaus ir ištempia balzganąjį dangalą. Tokį subrendusį folikulą patogiau stebėti ultragarsu, nes jis būna iki 2 cm. skersmens, o lytinės ląstelės skersmuo – 0,2 mm [14].

Ovuliacija. Dėl gausėjančio skysčio folikule didėja vidinis spaudimas. Veikiant gonadotropinams ir estrogenams, dėl refleksinio oksitocino bei proteolizinių fermentų poveikio folikulo sienelė, nukreipta į pilvo ertmę, suplonėja ir plyšta, įvyksta ovuliacija. Išsilaisvinusią iš kiaušidės kiaušialąstę švelniai pagauna kiaušintakio galuose esantys gaureliai (fimbrijos) ir įtraukia į kiaušintakį, kur ir gali įvykti apvaisinimas. Po ovuliacijos kiaušinėlis išgyvena tik iki 24 val. [14.32].

Liuteininė fazė. Į plyšusio folikulo ertmę iš sutrūkusio apvaskalėlio kraujagyslių patenka nedaug kraujo. Folikulinės ląstelės, veikiamos liutropino, pradeda daugintis ir užpildo buvusią ertmę. Šios ląstelės – gelsvos, todėl susidaręs darinys vadinamas geltonkūniu (*corpus luteum*), o grūdėtosios ląstelės virsta liuteininėmis. Geltonkūnio raida skirstoma į keturias fazes: proliferacijos (ląstelių dauginimosi), vaskuliarizacijos (kraujagyslių tinklo formavimosi), žydėjimo ir nykimo. Jei lytinė ląstelė neapvaisinta, prasideda menstruacijos, o kiaušidėse geltonkūnis virsta menstruaciniu geltonkūniu (*corpus luteum menstruatios*). Jei apvaisinta – nėštuminiu (*corpus luteum graviditatis*), ir gamina bei išskiria progesteroną, kol šią jo funkciją perima placenta. Nykstančiame geltonkūnyje gausėja jungiamojo audinio ir susidaro balkšvas kūnas (*corpus albicans*) [14].

Kiaušidę dengia pakitusi pilvaplėvė: vietoje plokščiojo mezotelio kiaušidės paviršiuje yra kubinio epitelio ląstelių sluoksnis. Kiaušidė sudaryta iš dviejų sluoksnių: išorinio (žievinio) ir vidinio (šerdinio). Žieviniame sluoksnyje, po balzganuoju kiaušidės dangalu (*tunica albuginea*), yra parenchima (*zona parenchymatosa*), kurią sudaro gausybė

folikulų. Giliau, šerdimame sluoksnyje, yra kraujagyslių, limfagyslių ir nervų. Apie 18 – 20-tą nėštumo savaitę baigiasi moteriškosios lyties vaisiaus germinacinių ląstelių diferenciacija – oogonijos virsta pirminiais folikulais ( *folliculi ovarii primarii* ), turinčiais lytinių ląstelių ( oocitų ) [14].

Naujagimės kiaušidėse yra ~ 400 000 pirminių folikulų, iš kurių tik 400 pasiekia ovuliacijos fazę [14].

Folikulų formavimosi ir vystymosi procesus reguliuoja gonadotropiniai hormonai: žmogaus chorioninis gonadotropinas ( *human chorionic gonadotropin* ) ir progesteronas ( *progesteronum* ). Žmogaus chorioninis gonadotropinas - lytinių liaukų funkciją kontroliuojantis hormonas. Jis veikia folikulų brendimą ir liuteinizaciją - padeda formuotis geltonkūniui ir išsiskirti progesteronui. HCC palaiko nėštumą, kol jį gaminti pradeda embriono trofoblasto ląstelės, o vėliau placenta. HCC preparatų skiriama per baigiamąjį ovuliacijos stimuliavimo etapą. Progesteronas ( *progesteronum* ) - moteriškas lytinis hormonas, kurį išskiria po ovuliacijos susidaręs geltonkūnis. Veikiama progesterono, kinta gimdos gleivinė - gimda ruošiasi priimti apvaisintą kiaušialąstę. Nėštumo metu progesteroną išskiria placenta [1].

Veikiant gonadotropiniams hormonams, apie oocitus kaupiasi grūdėtosios ląstelės, susiformuoja antriniai folikulai, kurie vėliau virsta pūsliniais folikulais ( *folliculi ovarii vesiculosi* ), turinčiais didžiausio ( 25  $\mu\text{m}$  ) skersmens moters organizmo ląstelę – lytinę ląstelę ( *ovulum* ) [12], (2 pav.).

Folikulas turi išorinį jungiamojo audinio apvaskalėlį ( *theca folliculi* ), kurį sudaro išorinis sluoksnis ( *tunica externa* ) ir vidinis ( *tunica interna* ). Po vidiniu jungiamojo audinio sluoksniu yra folikulinių ląstelių sluoksnis, vadinamas grūdėtoju ( *statum granulorum* ). Grūdėtojo sluoksnio ląstelėse vyksta steroidinių hormonų biosintezė [14].

Folikulo skystis, ištekėdamas į pilvo ertmę, išplauna lytinę ląstelę. Po ovuliacijos kiaušinėlis iš pilvo ertmės patenka į kiaušintakį ir jo ampulėje ( *ampulla tubae uterinae* ) dalijasi antrą kartą – antroji mejozė ( pirmoji mejozė įvyksta dar prieš ovuliaciją ). Folikulo

skystyje randama įvairių medžiagų: hormonų, citokinų, kitokio pobūdžio molekulių, kurios vienaip ar kitaip veikia besivystančią kiaušialąstę [12].

## **2. Pav. Subrendęs folikulas. Viduje aiškiai matoma kiaušialąstė.**



<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/>

Kiaušidės folikulai (*folliculi ovarici*) - ankstyvuojamuoju embrioniniu laikotarpiu moteriškosios lyties embriono kiaušidėse susidaro užuomazginių folikulų. Daugelis jų sunyksta, kiti, gonadotropinių hormonų ir biologiškai aktyvių medžiagų veikiami, virsta į labiau diferencijuotus folikulus, kuriuose ne tik bręsta kiaušialąstė, bet ir vyksta lytinių hormonų bei veikliųjų medžiagų sintezė, susijusi su moters vaisingumu. Per kiekvieną menstruacijų ciklą paprastai subręsta vienas folikulas [12,14].

## **2.3. Moterų nevaisingumas. Pagrindinės priežastys.**

Moterų nevaisingumas (*infertilitas feminina*) - gali būti pirminis, kai, moteris niekada nebuvo pastojusi, ir antrinis - kai moteris buvo nėščia, nesvarbu, kaip baigėsi nėštumas [14].

Moterys nevaisingos dažniausiai esti dėl anatominių ir funkcinių jų lytinių organų sutrikimų, bet nevaisingumo priežastimi gali būti ir įvairios kitos moters organizmo patologinės būklės. Medicininis požiūris nevaisingumas skirstomas į:

- pirminį, kai moteris niekada nebuvo pastojusi,
- antrinį, kai buvo pastojusi vieną ar daugiau kartų, bet pakartotinai pastoti nepavyksta [14].

Pirminis nevaisingumas – tai situacija, kai moteris praeityje nebuvo pastojusi ir vienerių metų laikotarpyje, sutuoktiniams nenaudojant jokių kontracepcijos priemonių, esant lytiniam santykiams ne mažiau 2 kartų per mėnesį, nepastoja (Skruibis, 1996). PSO duomenimis tai sudaro nuo 2 iki 10 proc. visų nevaisingumo atvejų.

Antrinis nevaisingumas nustatomas tada, kai moteris praeityje buvo pastojusi (gimdė, nėštumą nutraukė, įvyko savaiminis persileidimas arba buvo negimdinis nėštumas), bet daugiau dėl tam tikrų priežasčių nebepastoja, nors šeima to norėtų (Skruibis, 1996). Ši situacija gydymo atžvilgiu yra sudėtingesnė, o tokių atvejų skaičius pasaulyje yra nuo 10 iki 25 proc.

Absolūtus nevaisingumas – kai nesusiformavusios kiaušidės, gimda ir makštis, kiaušidėse nėra lytinių ląstelių arba lytiniai organai pašalinti operaciniu būdu. Reliatyvus nevaisingumas – tai sumažėjusi galimybė pastoti ir gydant šis nevaisingumas gali būti likviduotas.

Moterų nevaisingumo priežastys yra įvairios. Pagal priežastį skiriamos šios nevaisingumo formos:

1. kiaušintakinis (60%);
2. endokrininis (30%);
3. imuninis (5%);
4. dėl anatominių lytinių organų pakitimų (5%).

Kiaušintakinis nevaisingumas atsiranda po vidinių lytinių organų uždegimų – kiaušintakiai gali užakti, susiaurėti, dėl susidariusių sąaugų persilenkti, todėl kiaušintakiuose



susidaro anatominių kliūčių, trukdančių kiaušialąstei keliauti ir būti apvaisintai spermatozoido [14].

Endokrininio nevaisingumo priežastis yra sutrikusi ovuliacija – folikulo formavimasis ir trūkimas ciklo vidury dėl pakitusios kitų endokrininių liaukų funkcijos (pagumburio, posmegeninės liaukos, antinksčių, skydliaukės). Įgimti ir įgyti lytinių organų anatominiai pakitimai pasireiškia amenorėja (mėnesinių nebuvimu), įvairiais mėnesinių ciklo sutrikimais, po nėštumo nutraukimų (abortų), pažeidus gimdos gleivinę, persirgus gimdos gleivinės uždegimu, dėl lėtinių paūmėjančių uždegimų aplink kiaušintakius, kiaušides, gimdos ertmėje susidarius sąaugų, gimdos miomoms užspaudus kiaušintakio spindį ar deformuojant gimdos ertmę. Nevaisingumo priežastis gali būti lytinių organų endometritas, policistinių kiaušidžių sindromas, kuomet irgi nevyksta ovuliacija[14].

Imuniam nevaisingumui būdinga tai, kad moters organizme atsiranda imunitetas vyriškoms lytinėms ląstelėms ir susidaro specifinių spermatozoidams antikūnų.

Imuninio nevaisingumo gydymas yra sunkiausias ir iki galo dar neištirtas. Jeigu moters gimdos kaklelio gleivėse ir kraujyje randama specifinių spermai antikūnų, skiriamas jautrumą mažinantis gydymas.

Paskutinė priemonė gydant nevaisingumą yra dirbtinis apvaisinimas. Jis atliekamas dviem būdais: inseminacija *in vivo* ir dirbtinis apvaisinimas *in vitro*. Atliekant inseminaciją *in vivo*, moteriai pro gimdos kaklelio išorinę angą į gimdą suleidžiama jos vyro arba donoro spermatozoidų [34].

Atliekant dirbtinį apvaisinimą *in vitro*, iš moters paimamos kelios kiaušialąstės, iš vyro – sperma, lytinės ląstelės sujungiamos laboratorijoje ant objektinio stiklelio. Apvaisintos ląstelės laikomos specialiose sąlygose ir temperatūroje, kol pasidalina daugybę kartų. Iš kelių apvaisintų ląstelių gaunama keletas embrionų, iš kurių 2-3 įsodinami į gimdos ertmę, o kiti užšaldomi. Embrionai toliau vystosi moters gimdoje iki gimimo [34].

#### **2.4. Folikulinio skysčio fizinės, cheminės savybės, ląstelinė sudėtis.**

Folikulo skystis - skystis, pripildantis folikulo ertmę. Atlikus subrendusio folikulo punkciją, išsiurbtame skystyje randama kiaušialąstė [12].

Folikulinis skystis specifinė substancija, kurioje yra kiaušidžių sekrecijos produktų, leukocitų išskiriamų citokinų. Folikulinio skysčio leukocitai dalyvauja priešmikrobiniame ir priešvirusiniame imunitete. Esant fiziologinėm sąlygom šios kraujo ląstelės naikina per genitalinį traktą patekusius mikroorganizmus [31,16,30].

Ląstelių išskiriami produktai gali stimuliuoti arba slopinti kitų imuninių ląstelių aktyvumą [31].

Folikulinis skystis yra šviesiai gelsvos iki prisotintos geltonos spalvos, kartais dėl kraujo priemaišos įgyja rausvą spalvą, skaidrus, nekrešantis skystis. Santykinis tankis svyruoja 1.015 – 1.020 ribose. Baltymų, įeinančių į jo cheminę sudėtį, koncentracija svyruoja 10 – 25 g/l ribose [28].

Sinergetiškai veikiant folikulus stimuliuojančiam hormonui ir estrogenams, folikulas auga ir jame gaminasi folikulinis skystis, kuris kaupiasi ir suformuoja ertmę folikulo viduje. Veikiant folikulus stimuliuojančiam hormonui, folikuliniame skystyje kaupiasi ir dominuoja estrogenai. Geriausias subrendimo sąlygas turi tas oocitas, kuris yra greičiausiai augančiame folikule, nes ten yra daugiausia estrogenų ir geriausiai proliferuoja grūdėtosios ląstelės [14,33,32].

Progesteronas sustiprina proteolitinių fermentų veikimą, o šie kartu su prostaglandiniais suardo folikulo sienelę ir sukelia subrendusio preovuliacinio folikulo sienelės plyšimą [14].

#### **2.5. Leukocitų populiacijos randamos moters reprodukcinės sistemos audiniuose.**

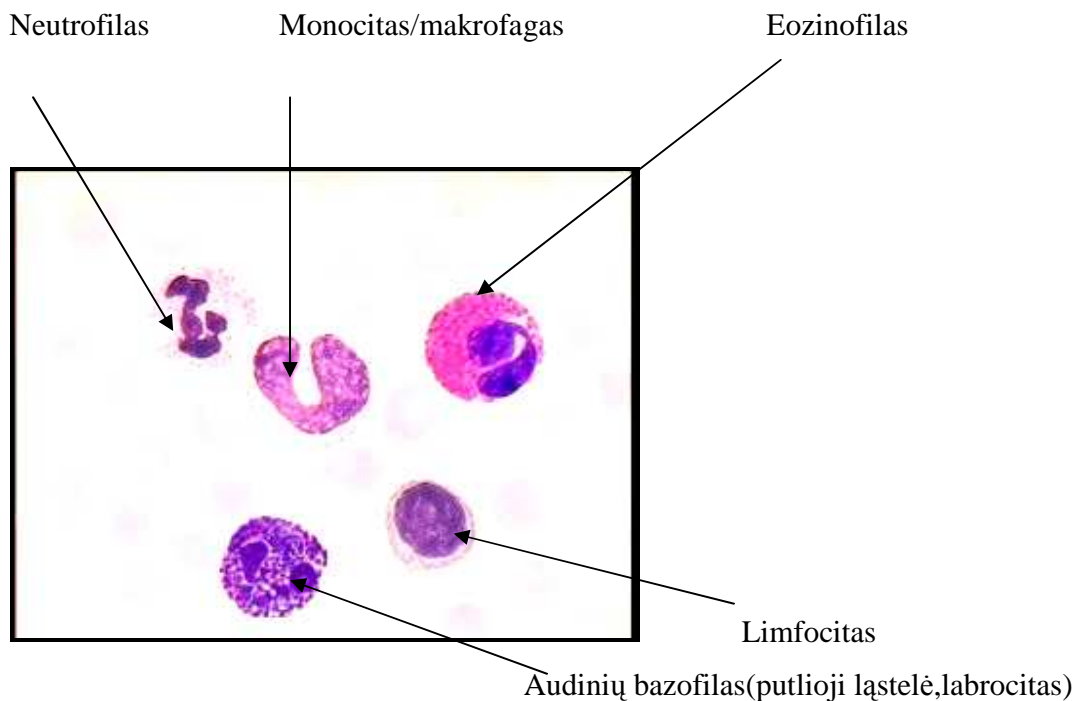
**Leukocitų vaidmuo moters reprodukcinėje sistemoje.**

Estrogenai veikia ne tik lytinių organų funkcijas. Jie stimuliuoja retikuloendotelinę sistemą, skatindami susidaryti daugiau antikūnų, aktyvina fagocitozę, todėl organizmas pasidaro atsparus infekcijai. Šiuose procesuose ypač aktyviai dalyvauja kraujo ląstelės – leukocitai. [33,38,49].

Didelę reikšmę gonadinių funkcijų reguliavime turi leukocitai, veikdami autokriniu ir parakriniu būdu[1].

Leukocitai – pagrindiniai potencialūs kiaušidžių funkcijos modulatoriai *in-situ*, jie veikia šalia endokrininės sistemos, jų išskiriami citokinai dalyvauja gametogenezėje. Įrodyta, kad imuninė ir endokrininė sistemos dalyvauja kiaušidžių vystymėsi ir kraujagyslių tinklo susidaryme, taip pat leukocitų migracijoje iš kraujotakos į organus. [38]. Monocitai/makrofagai, neutrofilai, limfocitai, audinių bazofilai (putliosios ląstelės, labrocitai) ir eozinofilai yra leukocitų populiacijos randamos moters reprodukcinės sistemos audiniuose [38](3 pav.).

### 3 pav. moters reprodukcinės sistemos audiniuose randamų leukocitų morfologija



[[www.lab.anhb.uwa.edu.au/.../Blood/blood.htm](http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/.../Blood/blood.htm)]

**Monocitai/makrofagai.** Migravę iš kraujo į audinius, jie diferencijuojasi į specifinius audinių makrofagus. Monocitai diferencijuojasi kaulų čiulpuose iš granulocitų ir monocitų bendro pirtako. Prieš virsdami makrofagais, monocitai gerokai pasikeičia: 5 – 10 kartų padidėja, sustiprėja jų sugebėjimas fagocituoti, citoplazmoje padaugėja organelių, jie pradeda sekretuoti biologiškai aktyvias medžiagas. Makrofagai pasklidę visuose audiniuose. Jie gali būti laisvi, migruojantys ir fiksuotieji [3,23,27]. Makrofagų membranose yra CD14 molekulė, visi trys IgG Fc fragmentų receptoriai ( FcγRI, FcγRII ir FcγRIII ), komplemento baltymų , citokinų receptoriai. Jų membranose gausu neimuninių receptorių, per kuriuos organizmas apvalomas nuo lipoproteinų, glikoproteinų metabolitų, pasenusių ląstelių, žuvusių audinių ( angl. *Scvenger receptors* ). Jie dalyvauja daugelyje biologinių reakcijų:

fagocituoja;

sekretuoja daugiau kaip 50 biologiškai aktyvių medžiagų;

dalyvauja žaizdų gijimo procesuose;

naikina navikines ląsteles;

dalyvauja specifinio imuninio atsako reakcijose [3,23,27].

Makrofagai fagocituoja ir sunaikina mikrobus, antigenines makromolekules. Tai svarbi nespecifinio imuniteto grandis. Labai aktyvi jų sekrecinė funkcija. Jie gali išskirti įvairius fermentus ir jų inhibitorius, komplemento komponentus, krešėjimo veiksnius, arachidono rūgšties metabolitus, reaktyvius deguonies junginius, azoto oksidą (NO), citokinus. Vienos medžiagos gaminamos nuolat ( pvz., komplemento baltymai ), kitos – makrofagus suaktyvinus ( citokinai, toksiniai deguonies radikalai ir kiti ). Fagocituodami žuvusias ląsteles ir audinius, išskirdami citokinus, kuriems veikiant vystosi fibrozė (išveša jungiamasis audinys), makrofagai padeda atsigauti audiniams gyjant žaizdoms. Navikines ląsteles makrofagai gali ardyti arba tiesiogiai išskirdami toksinius deguonies ir azoto oksido junginius, lizosominius fermentus, arba per nuo antikūnų priklausomą ląstelių citotoksiškumą ( APLC ) [3,23,27].

Pro fizikinius ir cheminius barjerus prasiskverbusį patogeną fagocituoja ir ardo į patogeno patekimo vietą migravę neutrofilai ir audinių makrofagai. Makrofagai moters reprodukcinės sistemos audiniuose yra gana gausi populiacija [21,28]. Bakterijų fagocitozė

makrofaguose sukelia biologiškai aktyvių medžiagų, citokinų, sintezę. Fagocituodami makrofagai išskiria šiuos citokinus: interliukinus 1, 6, 8 ir 12 ( IL-1, IL-6, IL-8, IL- 12 ) ir navikų nekrozės faktorių  $\alpha$  ( TNF $\alpha$  ). Šie sukelia daug reakcijų, pasireiškiančių uždegimu. Patogeno patekimo vietoje IL-1 ir TNF $\alpha$  aktyvina kraujagyslių endotelį, didėja jo pralaidumas ir molekulių, reikalingų leukocitams migruoti iš kraujo į audinius ( adhezijos molekulių ), ekspresija endotelio ląstelių membranose. Šie citokinai skatina adhezijos molekulių ekspresiją ir leukocitų membranose. IL-8 sukelia kryptingą neutrofilų judėjimą patogeno link, tai yra- jis chemotaksiškas neutrofilams. Dėl šių reakcijų patogeno lokalizacijos vietoje sustiprėja kraujotaka, kaupiasi skystoji kraujo dalis ir kai kurios makromolekulės ( komplekto baltymai, imonoglobulinai ) bei ląstelės – neutrofilai ir monocitai/makrofagai, kurios šiuo atveju vadinamos uždegiminėmis. Uždegimo židinyje patogenai aktyviai ardomi [3,21, 23,27].

IL-6 ( kiek mažiau IL-1 ir TNF $\alpha$  ) suaktyvina kepenų ląstelėse baltymų, vadinamų ūmios fazės baltymais, sintezę. Iš jų ypač svarbus C reaktyvus baltymas ( CRP ) bei manozę sujungiantis baltymas ( MSB ). CRP, susijungęs su kai kurių bakterijų ir grybelių sienelių lipopolisacharidų fosforilcholinine dalimi, o MSB – su jų sienelėse esančiomis manozės liekanomis, aktyvina komplementą ne tik alternatyviuoju būdu, ir tai gerokai sustiprina jų opsonizaciją ir lizę bei skatina uždegimą [3,21,23]. Makrofagai yra antigeną pateikiančios ląstelės [10]. Makrofagai vaidina svarbų vaidmenį moters organizme vykstančiuose reprodukcinuose procesuose, veikdami per lokalius parakrininius autokrininius reguliuojančius faktorius [13,15,19,26].

**Granulocitai.** Granulocitai – leukocitai, citoplazmoje turintieji daug granulų. Visi granulocitai subręsta kaulų čiulpuose. Jie sudaro 50 – 70 % cirkuliuojančio kraujo baltųjų ląstelių. Tai pagrindinės ūmaus uždegimo ląstelės. Jų citoplazmos granulės nevienodai nusidažo rūgštiniais ir šarminiais dažais, todėl granulocitai skirstomi į neutrofilus, eozinofilus, bazofilus [3].

**Neutrofilai.** Neutrofilai dar vadinami polimorfonuklearinėmis ląstelėmis, nes jų branduolys sudarytas iš kelių segmentų. Patekę iš kaulų čiulpų į kraują, subrędę neutrofilai cirkuliuoja 7 – 10 valandų, paskui migruoja į audinius, tarp jų ir moters reprodukcinės sistemos audinius, kur gyvena 3 – 4 paras. Cirkuliuojančių neutrofilų migravimas į audinius vadinamas ekstravazacija. Šiam procesui svarbi adhezijos molekulių ekspresija endotelio ir neutrofilų membranose, kurią reguliuoja citokinai [3,10,12].

Pagrindinė neutrofilų funkcija – fagocitozė. Pirminių ( lizosomų ) ir antrinių ( specifinių ) granulių fermentai, reaktyvūs deguonies ir azoto junginiai fagocituotus objektus sunaikina, o jų degradacijos produktai pašalinami egzocitozės būdu. Neutrofilų aktyvumą gali padidinti makrofagų išskiriami citokinai. Neutrofilų membranose yra IgG Fc fragmentų ( FcγR ) ir komplemento komponentų receptorių, kurių dėka neutrofilai gali fagocituoti opsonizuotas daleles. Be to, per FcγR jie gali dalyvauti nuo antikūnų priklausomo ląstelių citotoksiškumo reakcijos [3,10,12].

**Eozinofilai.** Kita granuliocitų populiacija aptinkama moters reprodukcinės sistemos audiniuose – eozinofilai [31]. Eozinofilų branduolys sudarytas iš dviejų segmentų, o specifinės citoplazmos granulės nusidažo rūgštiniais dažais ( eozinu ). Kraujyje yra mažiau nei 1 % bendro organizme esančių eozinofilų skaičiaus, likusieji – išsidėsto audiniuose. Eozinofilai sugeba fagocituoti ( antigeno-antikūno kompleksus, kai kurias bakterijas, audinių irimo produktus ), bet pagrindinė jų funkcija – saugoti organizmą nuo parazitinių infekcijų [3,35].

Eozinofilų membranose ekspresuojami IgG ir IgE Fc fragmentų ( FcγR ir FcεR ), komplemento komponentų receptoriai. Jų padedami eozinofilai gali prisitvirtinti prie antikūnais padengtų parazitų ir granulėse esančiais baltymais juos sunaikinti. Eozinofilų antrinių ( specifinių ) granulių baltymai – eozinofilų pagrindinis šarminis baltymas, eozinofilų katijoninis baltymas, eozinofilų kilmės neurotoksinas – yra toksiški parazitams. Eozinofilams chemotaktinius faktorius išskiria limfocitai (chemokinas eotaksinas), monocitai/makrofagai, putliosios ląstelės. Išskirdami pirminių ir antrinių granulių baltymus, eozinofilai gali pažeisti audinius vykstant alerginėms reakcijoms. Aktyvinti eozinofilai gamina prostaglandinus, citokinus, kurie palaiko uždegimą, aktyvindami endotelį, sutelkdami ir aktyvindami eozinofilus bei kitus leukocitus [3,35].

Nustatyta, kad kai kurių citokinų: interliukino – 3, IL – 5, granuliocitų – monocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus ( GM – CSF ) poveikis eozinofilams yra stimuliuojantis. Šie citokinai ne tik reguliuoja eozinofilų raidą iš hemopoetinių kamieninių ląstelių, bet palaiko jų gyvybingumą *in vivo*, taip pat gali sukelti eozinofilų degranuliaciją, stimuliuoti jų funkcinį aktyvumą, adheziją, chemotaksį, leukotrienų produkciją [18,19].

**Audinių bazofilai (putliosios ląstelės, labrocitai ).** Moters reprodukcinės sistemos audiniuose sutinkamos putliosios ląstelės. Putliųjų ląstelių ( labrocitai, audinių bazofilai ), kaip ir kitų kraujo ląstelių, ląstelė pirmtakė yra kaulų čiulpuose. Dar nesubrendusios putliosios

ląstelės juos palieka ir kraujas jas nuneša beveik į visus gerai vaskuliarizuotus audinius, ten jos ir subręsta. Putliosios ląstelės išsidėsto jungiamajame audinyje apie kraujagysles ir nervus. Ypač jų gausu odoje, kvėpavimo takų ir virškinamojo trakto, reprodukcinės sistemos gleivinėse. Putliųjų ląstelių bazofilinių granuliu turinys analogiškas bazofilų granuliu turiniui: jose yra histamino, proteazių, chemotaksinių faktorių, proteoglikanų. Savo membranose jos ekspresuoja didelio afiniškumo IgE Fc fragmentų ( FcεRI ) receptorius, komplemento baltymų receptorius. Putliosios ląstelės skirstomos į dvi grupes: jungiamojo audinio ir gleivinių. Gleivinių putliosios ląstelės išsidėsčiusios virškinamojo trakto gleivinėje ir tarp epitelio gaurelių, kvėpavimo bei reprodukcinės sistemos takų gleivinėse[1,31].

Aktyvintos putliosios ląstelės pradeda sekretuoti prostaglandinus, leukotrienus, citokinus IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantį faktorių ( *angl. Granulocyte – monocyte colony stimulating factor, GM – CSF* ), TNFα. Todėl jos gali dalyvauti įvairiuose fiziologiniuose, imuniniuose ir patologiniuose procesuose [2,3,10].

**Limfocitai.** Kita populiacija sutinkama moters reprodukcinės sistemos audiniuose – limfocitai. Limfocitai, tarp jų natūralūs kileriai ( NK ląstelės ) imuninės efektorinės ląstelės, kurios sintetina imunoreguliacinius citokinus:  $\gamma$  interferoną (  $\gamma$  – IFN ), granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantį faktorių ( *angl. Granulocyte – monocyte colony stimulating factor, GM – CSF* ); dalyvauja ankstyvame atsake į virusinius, bakterinius ir parazitinius patogenus [4,8,12].

Jos svarbios antivirusiniam ir antinavikiniam imunitetui. Pagrindinis šių ląstelių uždavinys – kuo geičiau atpažinti ląsteles taikinius ir juos sunakinti. Nuo T citotoksinių ląstelių priklausomoms imuninėms reakcijoms reikalingos antigeną pateikiančios ląstelės ( makrofagai ), kurios pirmos atpažįsta antigeną, perdirba jį ir susijungusios su ŽLA molekule pateikia T limfocitams. NK ląstelėms tokio sudėtingo mechanizmo nereikia [17].

Imunokompetentinių ląstelių ir reprodukcinės sistemos organų audinių ląstelių sintetinami citokinai, chemokinai, augimo faktoriai dalyvauja kaip lokalūs reprodukcinų procesų mediatoriai, citokinai dalyvauja moters reprodukcinų organų ląstelių proliferacijoje ir diferenciacijoje, reguliuoja folikulogenezę (folikulų susidarymą) ir steroidogenezę (steroidinių hormonų sintezę) [19,20].

## 2.6. Leukocitų išskiriami citokinai ir jų vaidmuo moters reprodukcinėje sistemoje.

Folikuliniam skystyje buvo nustatyti įvairūs citokinai: interleukinai, interferonai, kolonijas stimuliuojantys faktoriai ir augimo faktoriai (1 lentelė). Ne visų jų reikšmė dar yra žinoma [2].

Moters reprodukcinės sistemos audiniuose lokalizuotų leukocitų išskiriami citokinai-regulatoriniai peptidai, kuriuos produkuoja organizmo ląstelės (1 lentelė).

**1 lentelė. Folikulinio skysčio leukocitų sekretuojami produktai**

<b>Ląstelės</b>	<b>Produktai</b>
<b>Makrofagai/ Monocitai</b>	IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, kolagenazė, prostaglandinai, azoto oksidas
<b>Neutrofilai</b>	TNF- $\alpha$ , IL-1, prostaglandinai, lizocimai, kolagenazė, azoto oksidas
<b>Limfocitai</b>	IL-2, IL-6, GM-CSF, interferonai

[pagal Bukulmez ir Arici (2000)].

Moters reprodukcinės sistemos audiniuose lokalizuotų leukocitų išskiriami citokinai-regulatoriniai peptidai, kuriuos produkuoja organizmo ląstelės. Tai ir paprasti peptidai, ir sudėtingesnės molekulės su sudėtingomis disulfidinėmis jungtimis ir baltymai, sudaryti iš vieno ar kelių subvienetų, jų molekulinė masė nuo 5 iki 50 kD. Tai endogeniniai mediatoriai, juos sintetinti gali beveik visos branduolius turinčios ląstelės. Citokinų genai ekspresuojami visuose organizmo ląstelėse. Pastaruoju metu citokinams priskiriama apie 200 polipeptidinių medžiagų. Jas vienija biocheminiai ir funkciniai požymiai. Citokinai atlieka svarbų vaidmenį reguliuodami įvairias organizmo funkcijas [46].



Evoliucijos eigoje citokinų reguliacijos sistema vystėsi šalia kitų reguliacijos sistemų. Tam turėjo reikšmės poreikis tokių medžiagų, kurios galėtų perduoti signalą ir gretimai ląstelei, ir toliau esančioms, ir pačiai produkuojančiai ląstelei. Tokiu būdu, tai universali sistema, palyginti su adhezijos molekulėmis, kurių veikimo laukas kur kas siauresnis, ar hormonais, kurių sintezei reikia specialių organų (dažniausiai) ir medžiaga turi patekti į cirkuliaciją [43].

Citokinai veikia pleotropiškai į įvairiausias ląsteles, pagrinde, dalyvaujant apsauginių organizmo funkcijų sukūrimui ir vykdymui. Vietiškai tai pasireiškia formuojant tipišką uždegiminę reakciją, kurios metu sintetinami įvairūs citokinai, kurie veikia praktiškai visas ląsteles, kurios dalyvauja uždegiminėje reakcijoje: granulocitus, makrofagus, fibroblastus, endotelio ir epitelio ląsteles, o vėliau T ir B limfocitus. Imuninės sistemos ribose citokinai vykdo ryšį tarp nespecifinių apsauginių reakcijų ir specifinio imuniteto, veikdami abiem kryptim. Esant nepakankamai vietiniai apsauginiai reakcijai, citokinai patenka į cirkuliaciją. Tuomet jų poveikis pasireiškia sistemiškai organizmo lygyje [38,43].

Citokinai gali veikti praktiškai visus organus ir sistemas, dalyvauja homeostazės palaikyme. Organizme citokinai yra tarpininkai tarp imuninės, nervų, endokrininės, kraujodaros ir kitomis sistemomis. Jie tarnauja ryšininkais tarp šių sistemų, įtraukdami jas į organizavimą ir reguliavimą vieningos apsauginės reakcijos, jie formuoja ir reguliuoja visą kompleksą patofiziologinių pokyčių, atsirandančių patekus į organizmą patogeniui [9].

Esant nepakankamai vietiniai apsauginiai reakcijai, citokinai patenka į cirkuliaciją, tuomet jų poveikis pasireiškia sistemiškai organizmo lygyje. Tuomet citokinai gali veikti praktiškai visus organus ir sistemas, dalyvauja homeostazės palaikyme. Veikdami CNS, keičia visą kompleksą reakcijų, veikiančių elgesį, keičiasi hormonų sintezės santykis, indukuojama ūmios fazės baltymų sintezė kepenyse, vyksta augimo ir diferenciacijos faktorių genų ekspresija, keičiasi joninė plazmos sudėtis. Visų šių pokyčių charakteris neatsitiktinis, jie reikalingi apsauginės reakcijos aktyvacijai ir vykdymui, arba yra naudingi perskirstant energetinius srautus, siekiant maksimaliai išnaudoti galimybes apsaugoti organizmą [9,10].

Organizme citokinai yra tarpininkai tarp imuninės, nervų, endokrininės, kraujodaros ir kitomis sistemomis. Jie tarnauja ryšininkais tarp šių sistemų, įtraukdami jas į organizavimą ir

reguliuojamą vieningos apsauginės reakcijos, jie formuoja ir reguliuoja visą kompleksą patofiziologinių pokyčių, atsirandančių patekus į organizmą patogeniui [42,48].

Aktyvūs moters reprodukcinės sistemos veiklą reguliuojančių citokinų gamintojai yra makrofagai, jie reguliuoja imuninio atsako kryptingumą. Makrofagai ne tik vykdo barjerinę placentos funkciją, bet ir sintezuoja įvairius augimo faktorius, kurie reguliuoja trofoblasto, angiogenezės ir endometriumo decidualizacijos procesus. Tokiu būdu netiesiogiai įtakojama trofinė funkcija [46].

Ne mažiau svarbūs yra neutrofilų išskiriami citokinai (TNF- $\alpha$ , IL-1, prostaglandinai, lizocimai, kolagenazė, azoto oksidas) . TNF- $\alpha$  ir IL-1 suaktyvina kepenų ląstelėse baltymų, vadinamų ūmios fazės baltymais, sintezę. Iš jų ypač svarbus C reaktyvus baltymas ( CRB ) bei manozę sujungiantis baltymas ( MSB ). CRB, susijungęs su kai kurių bakterijų ir grybelių sienelių lipopolisacharidų fosforilcholinine dalimi, o MSB – su jų sienelėse esančiomis manozės liekanomis, aktyvina komplementą ne tik alternatyviuoju būdu, ir tai gerokai sustiprina jų opsonizaciją ir lizę bei skatina uždegimą [3].

Limfocitų išskiriami citokinai, tarp jų ir interferonas- $\gamma$  (INF-  $\gamma$ ) svarbūs kovojant su patogenais, be to, manoma, gali aktyviai dalyvauti nevaisingumo patogenezėje, implantacijos procesuose. Būtent limfocitų išskiriami citokinai turi įtakos tam, kad vaisiaus vystymosi mechanizmai vyktų sklandžiai, jie vykdo vietinę folikulo brendimo kontrolę, ir, gali būti, veikia funkcinės kiaušialąstės savybes [4].

Moters reprodukcinės sistemos audiniuose lokalizuotų leukocitų išskiriami citokinai-regulatoriniai peptidai, kuriuos produkuoja organizmo ląstelės. Tai ir paprasti peptidai, ir sudėtingesnės molekulės su sudėtingomis disulfidinėmis jungtimis ir baltymai, sudaryti iš vieno ar kelių subvienetų, jų molekulinė masė nuo 5 iki 50 kD. Tai endogeniniai mediatoriai, juos sintetinti gali beveik visos branduolius turinčios ląstelės. Citokinų genai ekspresuojami visuose organizmo ląstelėse. Pastaruoju metu citokinams priskiriama apie 200 polipeptidinių medžiagų. Jas vienija biocheminiai ir funkciniai požymiai. Citokinai atlieka svarbų vaidmenį reguliuodami įvairias organizmo funkcijas. Evoliucijos eigoje citokinų reguliacijos sistema vystėsi šalia kitų reguliacijos sistemų. Tam turėjo reikšmės poreikis tokių medžiagų, kurios galėtų perduoti signalą ir gretimai ląstelei, ir toliau esančioms, ir pačiai produkuojančiai ląstelei. Tokiu būdu, tai universali sistema, palyginti su adhezijos molekulėmis, kurių veikimo

laukas kur kas siauresnis, ar hormonais, kurių sintezei reikia specialių organų ( dažniausiai) ir medžiaga turi patekti į cirkuliaciją [41,43,46].

## **2.7. Interferono- $\gamma$ vaidmuo moters reprodukcinėje sistemoje.**

Folikulinis skystis sudaro mikroaplinką kiaušialąstei. Jame yra imunologinių veiksnių reguliuojančių kiaušialąstės augimą ir brendimą. Sąveika tarp endokrininės ir imuninės sistemų gali įtakoti kiaušidžių funkciją. Imunologinių faktorių folikuliniame skystyje sąstatas netiesiogiai įtakoja implantacijai ir ankstyvam embriono vystymuisi [28].

Folikuliniame skystyje ir aplinkiniuose audiniuose telkiasi limfocitai, kurie sintezuoja citokinus. Be limfocitų citokinus gali gaminti ir kiaušidžių somatinės ląstelės, t.y. liuteininės, stromos ir granuliozinės [24].

Prouždegiminiai Th1 tipo citokinai  $\text{INF}\gamma$  ir  $\text{TNF}\alpha$  – yra embriotoksiniai [27].  $\text{IL-1}\beta$  ir  $\text{TNF}\alpha$  reguliuoja trofoblasto ląstelių apoptozę, proteazių produkciją, angiogenezę ir trofoblasto citokinų, prostaglandinų ir hormonų biosintezę. Sveikų asmenų biologiniuose skysčiuose ir audiniuose citokinai yra nedidelių koncentracijų. Padidėjusi citokinų koncentracija rodo uždegiminį procesą ar ligos progresavimą, arba procesus į juo panašius, kaip aptarta anksčiau, tokie procesai vyksta moters reprodukcinio trakto audiniuose nevaisingumo ar vaisiaus atmetimo atveju [49].

Interferonai yra heterogeninė citokinų grupė, kurie pasižymi priešvirusiniu, priešproliferaciniu ir imunomoduliuojančiu poveikiu. Interferonas- $\gamma$  ( $\text{INF-}\gamma$ ), uždegimą stimuliuojantis citokinas.  $\text{INF-}\gamma$  buvo rastas folikuliniame skystyje, tačiau kitų uždegiminių citokinų nustatyti nepavyko arba tai buvo labai nedideli jų kiekiai [35]. Tai rodo, kad  $\text{INF-}\gamma$  yra svarbus, ypač infekcijos prevencijoje. Kai kurių eksperimentinių studijų su pelėmis duomenimis nei  $\text{INF-}\gamma$ , nei jo receptorius neturėjo įtakos vaisingumui ir nėštumo palaikymui [15,26], tačiau yra ir priešingų pranešimų [13,31].

### **3. TIRIAMOJI DALIS**

#### **3.1. Tyrimo medžiaga. Tiriamoji grupė**

Tyrimų objektas – folikuliniam skystyje esančios ląstelės. Medžiaga tyrimams renkama Vilniaus miesto “Vaisingumo klinikoje”. Tiriamasis darbas buvo atliekamas Vilniaus Greitosios Pagalbos universitetinės ligoninės Imunologijos laboratorijoje ir VU Imunologijos instituto Molekulinės imunologijos laboratorijoje.

Tiriamos 25 – 37 metų amžiaus 71 moterys, kurioms planuojamas atlikti dirbtinis apvaisinimas. Tyrime dalyvavo pacientės, kurioms atliktos pagalbinių apvaisinimo procedūros: dirbtinis apvaisinimas mėgintuvėlyje (IVF) arba intracitoplazminė spermatozoido injekcija (ICSI).

#### **3.2. Tiriamosios medžiagos surinkimas.**

Folikulinis skystis iš subrendusių folikulų į sterilius mėgintuvėlius renkamas atliekant kiaušidžių punkciją. Folikulo punkcija ir kiaušialąstės paėmimas: subrendusio folikulo punkcija atliekama specialia adata pro makštį, kontroliuojant makštiniu echoskopu davikliu, praėjus 36 val. po ovuliacijos skatinimo pabaigos. Tiriamoji medžiaga renkama folikulinės fazės vėlyvoje stadijoje. Tiriamoje medžiagoje skaičiuojamas bendras leukocitų skaičius ( šviesiniu mikroskopu ), naudojant Gorajjevo kamerą. Po šios procedūros bandiniai centrifuguojami, nupilamas supernatantas. Iš gautų nuosėdų gaminami preparatai, džiovinami, fiksuojami ir dažomi. Leukocitų populiacijos išaiškinamos apžiūrint preparatus pro mikroskopą. Naudojamas šviesinis mikroskopas ( Nikon, Japonija ), (objektyvas 40x, okuliaras 10x). Forminiai elementai skaičiuojami ką tik tyrimui paimtoje medžiagoje, nes ilgainiui in vitro ląstelės suyra.

Po šios procedūros bandiniai centrifuguoti 10 min 1500 aps/min greičiu, supernatantas surinktas ir užšaldytas -20° temperatūroje *Ependorf* tipo mėgintuvėliuose.

### 3.3. TYRIMO METODAI

#### 3.3.1. Leukocitų skaičiaus nustatymas.

Metodo principas: tiksliai nustatytame kameros tūryje pro mikroskopą skaičiuojami nepraskiesti tiriamosios medžiagos forminiai elementai, gautas kiekis išreikštas  $\times 10^6/\text{ml}$  tiriamosios medžiagos [28].

Goriajevo kamera pagaminta iš skaidraus stiklo plokštelės. Joje išraižyti 2 tinkleliai, atskirti skersiniu griovelio. Tinklelių šonuose yra šlifotos stiklo plokštelės, prie kurių prisitvirtina šlifotas dengiamasis stiklelis. Visas vieno tinklelio plotas – 0,9 mm<sup>2</sup>. kameros gylis 1/10 mm. Goriajevo kameros tinklelį sudaro 225 didieji kvadratai. Kvadratėlio tūris – 1/4000 mm<sup>3</sup>. Leukocitai skaičiuojami visuose didžiuosiuose kvadratuose [28].

Eiga: prieš užpilant tiriamąją medžiagą, kamera uždengiama dengiamuoju stikleliu, jis pritrinamas, kol pasirodo Niutono žiedai. Bandinio turinys gerai išmaišomas. Kadangi folikuliniame skystyje yra nedaug forminių elementų, jis neskiedžiamas. Pipete lašinamas lašas ant kameros po pritrintu dengiamuoju stikleliu. Tiriamojoje medžiagoje esantys forminiai elementai užpildo tarpą tarp kameros ir pritvirtinto dengiamąjo stiklelio ir nusėda kvadratuose. Skaičiuojama šviesiniu mikroskopu (okuliaras 10x, objektyvas 8x) visuose didžiuosiuose kvadratuose. Skaičiuojamos visos ląstelės (išskyrus eritrocitus), esančios kvadrato viduryje ir ant dviejų pasirinktų kraštinių. Leukocitų skaičius apskaičiuojamas pagal formulę:

$$X = \frac{a \times 4000}{b}, \text{ kur}$$

a – suskaičiuotų kameroje leukocitų skaičius

1/4000 – mažojo kvadratėlio tūris

b – kvadratėlių skaičius

Skaičiuojant folikulinio skysčio leukocitų kiekį 1 ml, gautas skaičius dauginamas iš  $10^6$  [28,36].

### 3.3.2. Leukocitų populiacijų nustatymas.

Leukocitų populiacijų diferenciacijai daromi nucentrifuguoto folikulinio skysčio nuosėdų tepinėliai. Folikulinis skystis centrifuguotas 10 min. 1500 aps/min norint nusodinti ląsteles. Supernatantą nupylus iš nuosėdų padaryti tepinėliai, kurie buvo dažomi 5 – 10 min. Giemzos – Romanovskio būdu [28].

Leukocitų formų tarpusavio santykis, išreikštas procentais, vadinamas leukograma. Leukogramoje skaičiai yra santykiniai. Perskaičiavus absoliučiais skaičiais, gaunamas tikras leukocitų formų kiekis. Absoliutų leukocitų kiekį 1 ml tiriamosios medžiagos galima apskaičiuoti pagal formulę:

$$X = \frac{a \times b}{100}, \text{ kur}$$

a – leukocitų kiekis 1 ml tiriamosios medžiagos

b – leukocitų kiekis % formulėje.

Folikulinio skysčio leukograma skaičiuojama nudažius tepinėlius Giemzos – Romanovskio metodu [28].

Darbo eiga: atsargiai nupylus supernatantą, iš gautų nuosėdų ruošiami tepinėliai: lašas nuosėdų lašinamas ant švaraus nuriebalinto objekcinio stiklelio ir braukiant šlifuotu kito stikliuko galu padaromas tolygus tepinėlis. Džiovinama ore, kambario temperatūroje. Išdžiuvęs tepinėlis 5 min. fiksuojamas fiksaže ( 50ml Giemzos –Romanovskio dažų, 75ml

May Griunvald dažų ir 750ml etilo spirito 96% ). Fiksuoti tepinėliai dažomi 5 – 10 min. Giemzos – Romanovskio dažais ( 20ml Giemzos – Romanovskio dažų ir 250ml pagrindinio Buferio ).

Dažyti tepinėliai plaunami po tekančiu vandeniu ir džiovinami. Leukogramai skaičiuoti naudojamas šviesinis mikroskopas ( Nikon, Japonija ) ( objektyvas 100x, okuliaras 10x ), imersinė sistema. Tepinėlis traukiamas zigzagu, skaičiuojama 100 leukocitų, atskiriant jų formas [28,36].

### **3.3.3. Interferono- $\gamma$ koncentracijos nustatymas imunofermentiniu metodu**

IFN-  $\gamma$  nustatymui folikuliniame skystyje naudojome komercinį IFN- $\gamma$  ELISA rinkinį (R & D Systems, Mineapolis, JAV). Dvigubo imunofermentinio metodo pagalba nustatėme gama interferono kiekį. Standartuose ir pavyzdžiuose esantis IFN-  $\gamma$  specifiskai jungėsi prie plokštelėje pre-inkubuotų polikloninių antikūnų. Reakciją stabdėme sieros rūgštimi, spalvos intensyvumas tiesiogiai proporcingas IFN-  $\gamma$  kiekiui mėginiuose. Mėginių koncentracijos nustatytos pagal standartinę kreivę.

Darbo eiga:

Reagentų paruošimas

1. Visi reagentai turi būti kambario temperatūros.
2. Plovimo buferis: jei koncentrate atsirado kristalų, atšildomas iki kambario temperatūros ir maišomas atsargiai kol kristalai ištirps. Praskiedžiamas 20 ml plovimo buferio koncentrato distiliuotame vandenyje , norint gauti 500 ml plovimo buferio.
3. Substratas: spalvos reagentai A ir B turi būti sumaišomi vienodais kiekiais ir mišinys sunaudojamas per 15 min. Duobutei reikia 200  $\mu$ l mišinio.
4. IFN- $\gamma$  standartas: praskiedžiamas IFN- $\gamma$  standartas kalibratoriumi RD6-21, paruošiamas 1000 pg/ml tirpalo. Standartui leidžiama nusistovėti mažiausiai 15 min. prieš ruošiant tirpalą.

5. Mėgintuvėliai: išpipetuojama 500 µl kalibratoriaus RD6-21 į kiekvieną mėgintuvėlį. Kruopščiai išmaišomas tirpalas kiekviename mėgintuvėlyje prieš atliekant sekantį praskiedimą. Nepraskiestas standartas yra 1000 pg/ml. Kalibratorius RD6-21 yra nulinis standartas t.y. 0 pg/ml.

#### Eiga

1. Visi reagentai ir pavyzdžiai turi būti kambario temperatūros.
2. Pridedama 100 µl tirpalo RD1-51 į kiekvieną duobutę.
3. Pridedama 100 µl standaro, pavyzdžio ir kontrolės į kiekvieną duobutę. Reagentai pridedami į duobutes nepertraukiamai ne ilgiau kaip per 15 min. Uždengiama. Inkubuojama 2 val kambario temperatūroje.
4. Išsiurbiamas duobučių turinį, 4 kartus praplaunamas. Plovimui naudojamas plovimo buferis (400 µl). Po paskutinio praplovimo, pašalinami bet kokie plovimo buferio likučiai, lėkštelė apverčiama ant sugeriamo popieriaus.
5. Pridedama 200 µl IFN-γ konjugato į kiekvieną duobutę. Uždengiama, inkubuojama 2 val. kambario temperatūroje.
6. Plaunama kaip nurodyta 4 punkte.
7. Pridedama 200 µl substrato tirpalo į kiekvieną duobutę. Inkubuojama 30 min. kambario temperatūroje. Saugoma nuo šviesos.
8. Pridedama 50 µl *Stock* tirpalo į kiekvieną duobutę. Spalva turi pasikeisti iš žydros į geltoną. Jei spalva nepasikeičia, galima šiek tiek pavartyti lėkštelę, kad susimaišytų reagentai.
9. Įvertinamas kiekvienos spalvos intensyvumas per 30 min., naudojant skaitytuvą prie 450 nm. Taip pat galima nustatyti 540 nm ar 570 nm. Reikšmės gautos prie 450 nm. Gali būti aukštesnės ir mažiau tikslios.



### 3.3.4. Statistinė duomenų analizė

Statistinis duomenų apdorojimas atliktas programa Excel 2003 ir MedCalc (Belgija). Duomenys pateikti apskaičiuavus aritmetinį vidurkį ir standartinius nuokrypius. Naudotas Stjudento t-testas, pagal jį rezultatai yra reikšmingi, kai  $p < 0,05$ . Duomenų grafiniam statistiniam atvaizdavimui naudojome Box and Whisker grafiką, kuriame pateikta mediana, kvartilės, ribos ir ekstremalūs taškai.

## 4. DARBO REZULTATAI

### 4.1. Nevaisingų moterų folikulinio skysčio leukocitų kiekis.

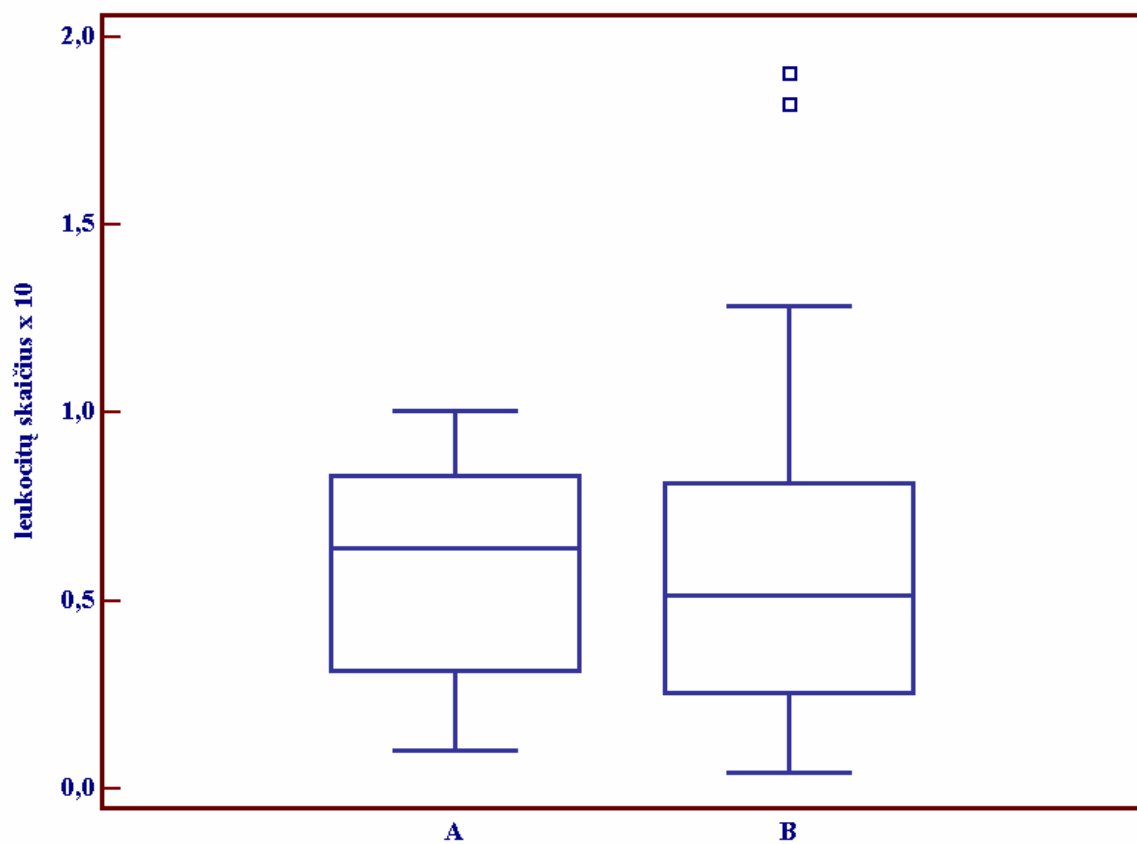
Tirtas septyniasdešimt vienos moters folikulinis skystis. 4 iš jų buvo netinkami, nes atliekant kiaušidžių punkciją, į juos pateko kraujo. Tiriamosios sugrupuotos pagal ovuliacijos pobūdį (normali, nenormali) ir nevaisingumą sukėlusią priežastį (pirminis, antrinis), taip pat buvo dalis sveikų moterų, kurioms nevaisingumas nebuvo diagnozuotas, nevaisingi buvo jų sutuoktiniai.

Tiriant nevaisingų moterų folikulinį skystį, absoliutus leukocitų skaičius buvo:

- esant normaliai ovuliacijai  $0,58 \pm 0,30 \times 10^6$
- esant sutrikusiai ovuliacijai  $0,65 \pm 0,26 \times 10^6$
- esant pirminiam nevaisingumui  $0,62 \pm 0,38 \times 10^6$
- esant antriniam nevaisingumui  $0,57 \pm 0,34 \times 10^6$
- sveikų moterų  $0,58 \pm 0,31 \times 10^6$ .

Neradome statistiškai reikšmingo skirtumo, lygindami leukocitų skaičių tiriamųjų folikuliniame skystyje (4 pav.). Tačiau, kaip matome 4 pav., nors nevaisingų moterų mediana buvo šiek tiek mažesnė, leukocitų svyravimų ribos buvo didesnės nei sveikų moterų grupėje.

**4 pav. Leukocitų skaičius sveikų ir nevaisingų moterų folikuliniame skystyje (A – sveikos moterys, B- nevaisingos moterys).**

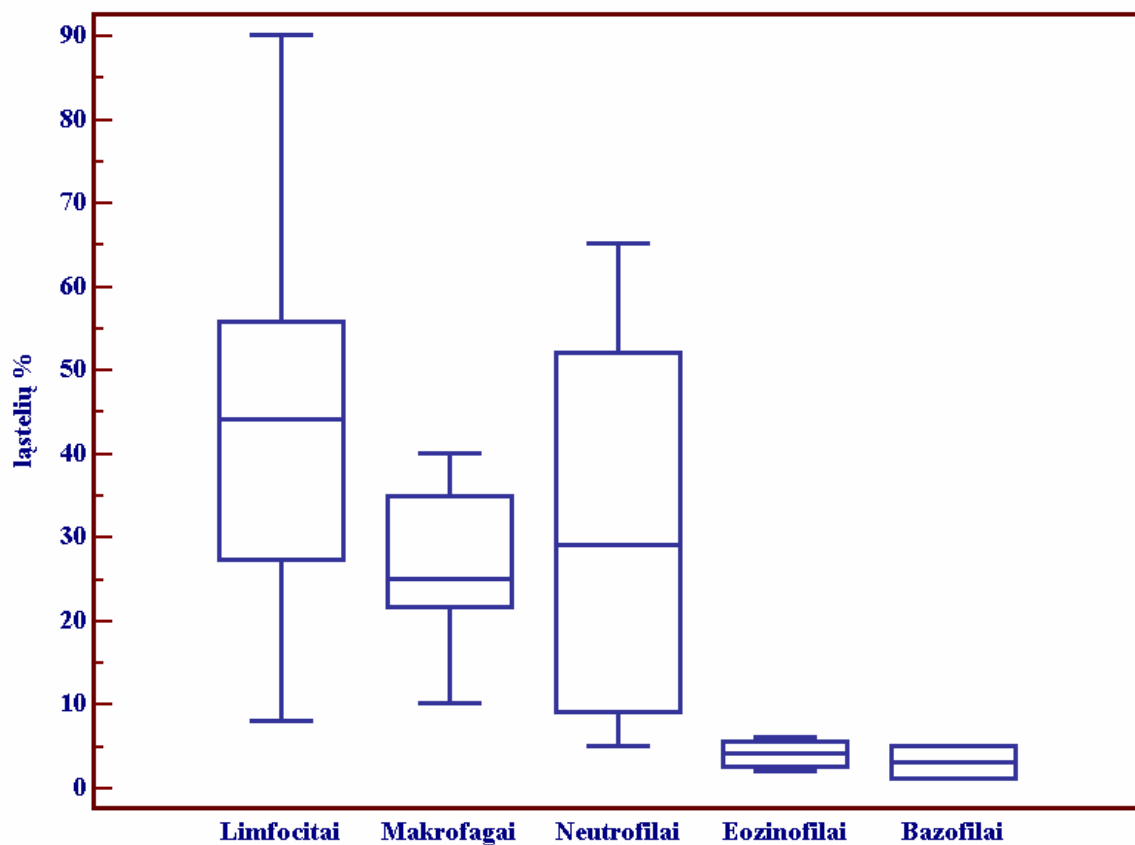


#### **4.2. Nevaisingų moterų folikulinio skysčio leukocitų populiacijos.**

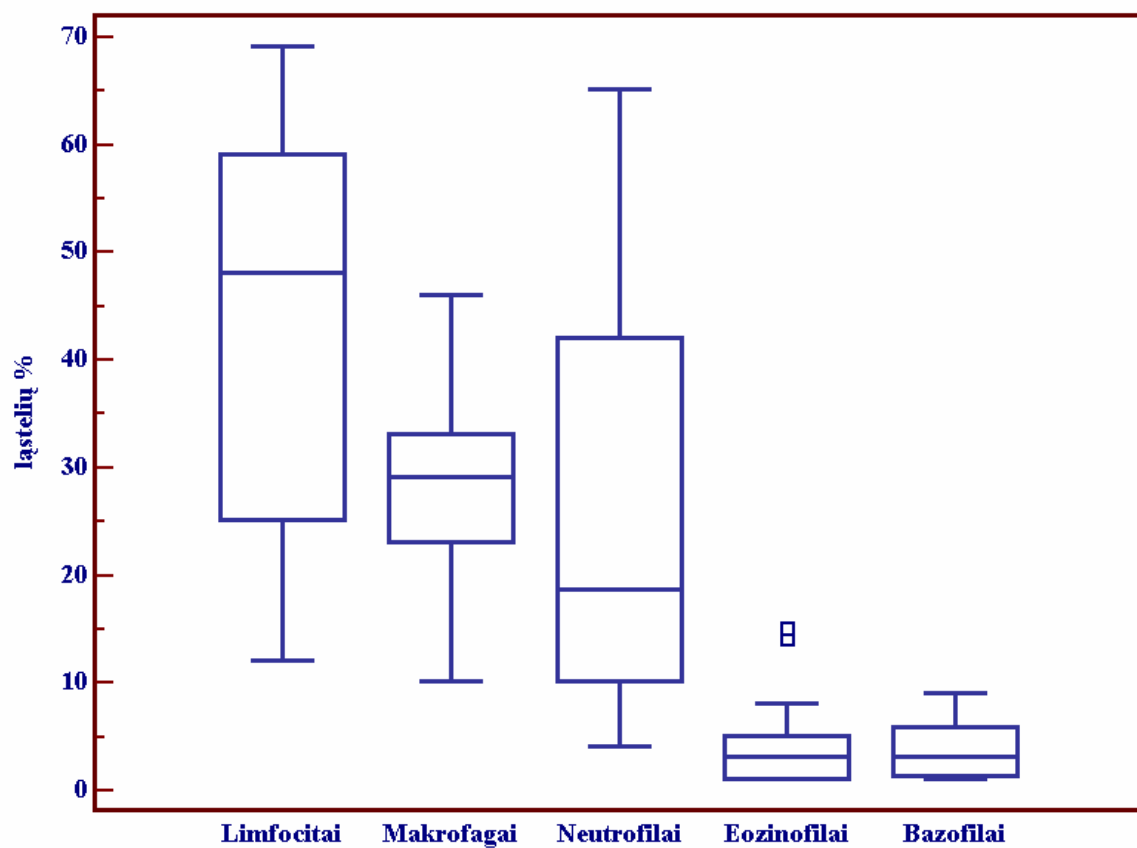
Moterų folikuliniame skystyje nustatytos leukocitų populiacijos: makrofagai, neutrofilai, limfocitai, audinių bazofilai (putliosios ląstelės) ir eozinofilai.

Nustatėme leukocitų populiacijų skaičių sveikų moterų folikuliniam skystyje (n=10) (nevaisingumo priežastis – vyro nevaisingumas) (5 pav) ir nevaisingų moterų folikuliniam skystyje (6 pav). Nors statistškai patikimo skirtumo neradome ( $p>0,1$ ), neutrofilų mediana buvo mažesnė nevaisingų moterų grupėje (18,2%) lyginant su sveikomis moterimis (29,1%). Šiek tiek daugiau limfocitų, eozinofilų ir putliųjų ląstelių buvo nevaisingų moterų folikuliniam skystyje.

**5 Pav. Leukocitų populiacijos sveikų moterų folikuliniam skystyje.**

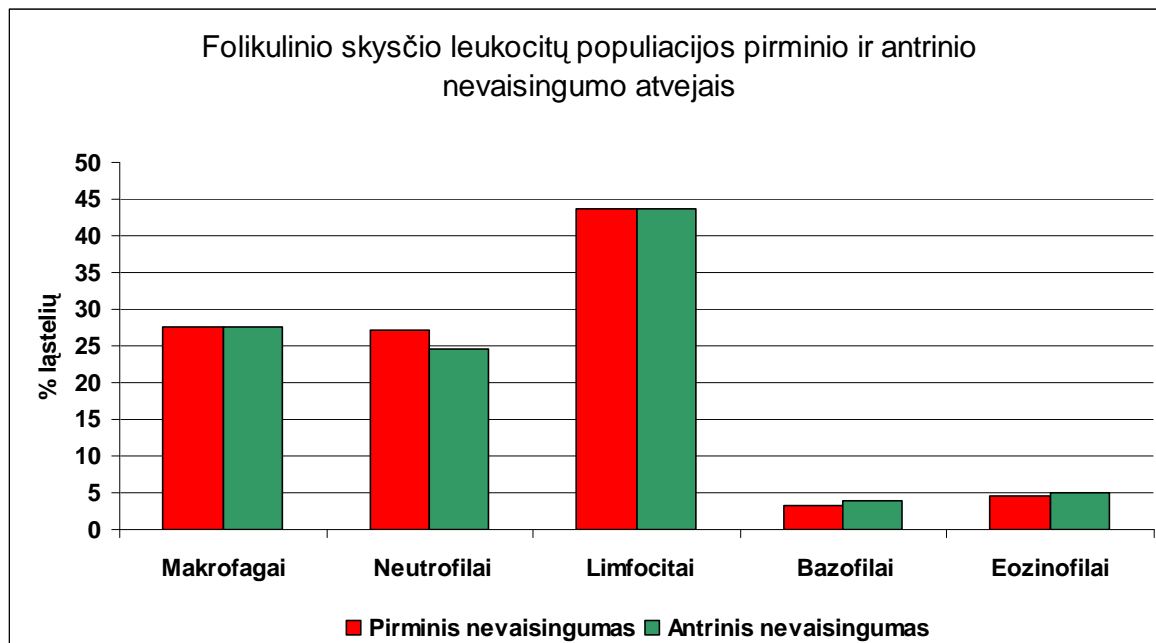


**6 Pav. Leukocitų populiacijos nevaisingų moterų folikuliniam skystyje.**



Leukocitų populiacijų skaičius buvo panašus tiek pirminio tiek ir antrinio nevaisingumo atvejais (7 pav),(2 lentelė).

7 pav. Folikulinio skysčio leukocitų populiacijos pirminio ir antrinio nevaisingumo atvejais.



2 lentelė. Folikulinio skysčio leukocitų populiacijos pirminio ir antrinio nevaisingumo atvejais.

Leukocitų populiacijos	Pirminis nevaisingumas	Antrinis nevaisingumas
	(%) n=16	(%) n=6
Makrofagai	27,6±8,5	27,7±7,1
Neutrofilai	27,2±19,8	24,6±17,5
Limfocitai	43,8±19,9	43,6±17,0
Bazofilai	3,2±2,4	4,0±2,9
Eozinofilai	4,5±4,0	5,0±4,6

### 4.3 Interferono- $\gamma$ koncentracija nevaisingų moterų folikuliniame skystyje

Tirta citokino IFN- $\gamma$  koncentracija 52 folikulinio skysčio mėginiuose, gautuose kiaušidžių punkcijos metu.

Pirminio nevaisingumo atveju (n=34) folikuliniame skystyje 6 atvejais (18%) nustatytas IFN-  $\gamma$ . Koncentracija svyravo nuo 0,1 iki 32,0 pg/ml (vidurkis  $16,7 \pm 14,3$  pg/ml) (2 lentelė). Kaip paaiškėjo vėliau, nei viena iš šių moterų, kurių folikuliniame skystyje buvo rastas IFN-  $\gamma$ , nepastojo. Antrinio nevaisingumo atveju nenustatėme IFN-  $\gamma$  folikuliniame skystyje (3 lentelė).

**3 lentelė. IFN- $\gamma$  koncentracija folikuliniame skystyje.**

Nevaisingumas	IFN-gama (pg/ml )	
	Taip	Ne
Pirminis N = 34	N= 6 (18 %) Min-Max 0,1-32,0 Vidurkis $16,7 \pm 14,3$	N= 34
Antrinis N = 18	-	N=18

## 5.REZULTATŲ APITARIMAS

Moters reprodukcinės sistemos audiniuose lokalizuotos leukocitų populiacijos: monocitai/makrofagai, neutrofilai, limfocitai, audinių bazofilai (putliosios ląstelės, labrocitai) ir eozinofilai yra veiksniai dalyvaujantys lokaliuose fiziologiniuose procesuose, vykstančius šiame trakte.

Kaip ir endokrininės sistemos veiksniai, jie veikia gametogenezę, dalyvauja kiaušidžių vystymęsi ir kraujagyslių tinklo susidaryme, taip pat leukocitų migracijoje iš kraujotakos į organus [38].

Moters reprodukcinės sistemos audinių leukocitai dalyvauja daugelyje biologinių reakcijų, jie fagocituoja, sekretuoja daugiau kaip 50 biologiškai aktyvių medžiagų, dalyvauja žaizdų gijimo procesuose, naikina navikines ląsteles, dalyvauja specifinio imuninio atsako reakcijose.

Palyginus su krauju moters reprodukcinės sistemos audiniuose esančių leukocitų skaičius (vidutiniškai  $0,6 \times 10^6/l$ ) skiriasi nuo skaičiaus leukocitų, cirkuliuojančių sisteminėje kraujotakoje.

Lyginant su kraujyje esančiomis populiacijomis ir jų santykiu, folikuliniame skystyje rastas gana didelis makrofagų skaičius (apie 27 %), kai kraujo monocitų normaliai randama iki 10%. Jų morfologija taip pat skiriasi, folikulinio skysčio makrofagai yra kelis kartus didesni, su ryškiai išreikštom stambiom granulėmis.

Makrofagai fagocituoja ir sunaikina mikrobus, antigenines makromolekules, sekretuoja bioaktyvias molekulas, neutrofilai ir audinių makrofagai fagocituoja ir ardo prasiskverbusius patogenus.

Makrofagai moters reprodukcinės sistemos audiniuose yra gana gausi populiacija. Bakterijų fagocitozė makrofaguose sukelia biologiškai aktyvių medžiagų, citokinų, sintezę. Fagocituodami makrofagai išskiria šiuos citokinus: interliukinus 1, 6, 8 ir 12 (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) ir navikų nekrozės faktorių  $\alpha$  ( $TNF\alpha$ ). Šie sukelia daug reakcijų, pasireiškiančių uždegimu.

Makrofagai vaidina svarbų vaidmenį moters organizme vykstančiuose reprodukcinuose procesuose, veikdami per lokalius parakrininius autokrininius reguliuojančius faktorius [15,19,26].

Priešingai, nei kraujyje, folikuliniame skystyje yra mažiau neutrofilų, tai sudaro mažiau nei 25%. Neutrofilai moters reprodukcinės sistemos audiniuose gyvena 3 – 4 paras. Jų migraciją ir skverbimąsi į audinius reguliuoja citokinai. Pagrindinė neutrofilų funkcija – fagocitozė. Neutrofilų aktyvumą gali padidinti makrofagų išskiriami citokinai. Neutrofilų membranose yra IgG Fc fragmentų ( Fc $\gamma$ R ) ir komplemento komponentų ( CR ) receptorių, kurių dėka neutrofilai gali fagocituoti opsonizuotas daleles. Be to, per Fc $\gamma$ R jie gali dalyvauti nuo antikūnų priklausomo ląstelių citotoksiškumo reakcijose [3].

Gausi leukocitų populiacija sutinkama moters reprodukcinės sistemos audiniuose – limfocitai. Priešingai, nei kraujyje, folikuliniame skystyje vyrauja limfocitai( apie 46%), tai rodo, kad šio tipo ląstelės yra svarbios lokaliuose fiziologiniuose procesuose vykstančiuose moters reprodukcinės sistemos audiniuose. Limfocitai, tarp jų natūralūs kileriai ( NK ląstelės ) imuninės efektorinės ląstelės, kurios sintetina imunoreguliacinius citokinus: interferoną-  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$  ), granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantį faktorių ( *angl. Granulocyte – monocyte colony stimulating factor, GM – CSF* ); dalyvauja atsake į virusinius, bakterinius ir parazitinius patogenus, jos svarbios antivirusiniam ir antinavikiniam imunitetui.

Imunokompetentinių ląstelių ir reprodukcinės sistemos organų audinių ląstelių sintetinami citokinai, chemokinai, augimo faktoriai dalyvauja kaip lokalūs reprodukcinų procesų mediatoriai. Dauguma makrofagų sintetinamų citokinų dalyvauja moters reprodukcinų organų ląstelių proliferacijoje ir diferenciacijoje, reguliuoja folikulogenezę(folikulų susidarymą) ir steroidogenezę(steroidinių hormonų sintezę) [19,20].

Ne tokia gausi leukocitų populiacija aptinkama moters reprodukcinės sistemos audiniuose – eozinofilai. Manoma, kad be savo pagrindinės evoliucijos eigoje susiformavusios funkcijos- antiparazitinio veikimo, jie dar dalyvauja moters reprodukcinės sistemos patologinių procesų išsivystyme, o jų aktyvumą stimuliuoja kitų leukocitų išskiriami citokinai. Šie citokinai ne tik reguliuoja eozinofilų raidą iš hemopoetinių kamieninių ląstelių, bet palaiko jų gyvybingumą *in vivo*, taip pat gali sukelti eozinofilų degranuliaciją, stimuliuoti jų funkcinių aktyvumą, adheziją, chemotaksį, leukotrienų produkciją [18,19].



Folikuliniam skystyje randamas kiek didesnis procentas putliųjų ląstelių (bazofilų, labrocitų), nei kraujyje, tai sudaro apie 3-4%. Jie savo morfologija kiek kitokie, nei kraujo bazofilai, didesni ir su ryškesniais degranuliacijos požymiais. Moters reprodukcinės sistemos audiniuose sutinkamos putliosios ląstelės (bazofilai, labrocitai) išsidėsto jungiamajame audinyje apie kraujagysles ir nervus. Ypač jų gausu reprodukcinės sistemos gleivinėse. Putliosios ląstelės skirstomos į dvi grupes: jungiamojo audinio ir gleivinių. Aktyvintos putliosios ląstelės pradeda sekretuoti prostaglandinus, leukotrienus, citokinus IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantį faktorių ( *angl. Granulocyte – monocyte colony stimulating factor, GM – CSF* ), TNF $\alpha$ . Todėl jos gali dalyvauti įvairiuose fiziologiniuose, imuniniuose ir patologiniuose procesuose [3].

Leukocitų skaičius nustatytas folikuliniam skystyje sveikų ir nevaisingų moterų buvo panašus ir statistiškai nesiskyrė. Pirminio nevaisingumo atveju leukocitų buvo šiek tiek daugiau nei antrinio nevaisingumo atveju.

Nevaisingų moterų folikuliniam skystyje buvo nustatytos leukocitų populiacijos: makrofagai, neutrofilai, limfocitai, audinių bazofilai (putliosios ląstelės) ir eozinofilai. Nevaisingų moterų folikuliniam skystyje nustatyta daugiau limfocitų ir mažiau neutrofilų nei sveikų moterų folikuliniam skystyje.

Galima daryti prielaidą, kad moters reprodukcinės sistemos audiniuose esančių leukocitų kiekis patologinių mechanizmų išsivystyme yra mažiau reikšmingas, nei jų atskirų populiacijų pagausėjimas.

Kaip jau minėjau moters reprodukcinės sistemos organuose įvairių fiziologinių procesų metu (ovuliacijos, menstruacijų, implantacijos) vyksta procesai, kurių mechanizmai panašūs į uždegiminiuosius mechanizmus, šiuose procesuose aktyviai dalyvauja moters reprodukcinės sistemos audiniuose išsidėstę leukocitai. Prieš ovuliaciją folikulo sienelėje kaupiasi uždegiminės ląstelės: neutrofilai, makrofagai, ovuliacijos metu kiaušidėse randamas padidintas kiekis leukocitų išskiriamų citokinių. Leukocitų skaičių ir santykį, migraciją į moters reprodukcinės sistemos audinius reguliuoja chemotaksinės medžiagos sintezuojamos tiek audinių, tiek imunokompetentinių ląstelių.

Yra duomenų, kad interliukino – 8 ir monocitų chemotaksio baltymo ( MCP ) kiekis moters reprodukcinės sistemos audiniuose koreliuoja su neutrofilų ir makrofagų skaičiumi [22].

Nustatėme citokiną IFN- $\gamma$  folikuliniame skystyje. Šis citokinas kiaušialąstės augimo ir vystimosi aplinkoje, manome, gali turėti netiesioginę įtaką implantacijai. Nevaisingų moterų folikuliniame skystyje nustatėme IFN- $\gamma$  (11,5% tirtų atveju); nustatytas IFN- $\gamma$  gali būti netiesioginis nesėkmingos implantacijos rodiklis pirminio nevaisingumo atveju, nes nei viena moteris nepastėjo, kurios folikuliniame skystyje nustatėme IFN- $\gamma$ .

Atlikta tik viena studija, kurioje tirtas IFN- $\alpha$  folikuliniame skystyje prieš dirbtinio apvaisinimo procedūras [22]. Tai rodo, kad IFN- $\alpha$  dalyvauja reprodukcinuose procesuose, neesant infekcijos. Folikuliniame skystyje IFN- $\gamma$  tirtas nebuvo, tuo jis mūsų tyrime įdomus. IFN- $\gamma$  – tai Th1 tipo uždegimą stimuliuojantis citokinas, kurį gamina NK ląstelės, T limfocitai. Mūsų gautais duomenimis, folikuliniame skystyje randamas IFN- $\gamma$  gali būti netiesioginis nesėkmingos implantacijos rodiklis pirminio nevaisingumo atveju.

Yra žinoma, kad imunokompetentinės ląstelės, lokalizuotos folikulo zonoje, sugeba produkuoti platų citokinų spektrą, kurie gali vykdyti vietinę folikulo brendimo kontrolę, ir, gali būti, veikti funkcines kiaušialąstės savybes.

Kiaušialąstės vystymosi etapai, implantacija ir vaisiaus vystymasis yra nuo citokinų priklausomi procesai ir kontroliuojami imuninės sistemos. Pagrindiniai citokinų šaltiniai yra imunokompetentinės ląstelės, kurios lokalizuotos visuose genitalinio trakto organuose: kiaušidėse, gimdos endometriume, makštyje. Šiuo metu imuninės sistemos ląstelėms ir jų produkuojamiems citokinams skiriama vis daugiau dėmesio, nes pripažįstama, kad normaliai gestacinio periodo tėkmei turi įtakos imuninių mechanizmų efektyvumas, jų gebėjimas palaikyti toleranciją vaisiaus antigenams. Vis dar neaiškūs lieka citokinų balanso pokyčiai embriono implantacijos periodu. Ankstyvųjų nėštumo etapų imuninis reguliavimas folikulų brendimo, apvaisintos kiaušialąstės implantacijos, vis dar menkai ištirtas. Yra žinoma, kad imunokompetentinės ląstelės, lokalizuotos folikulo zonoje, sugeba produkuoti platų citokinų spektrą, kurie gali vykdyti vietinę folikulo brendimo kontrolę, ir, gal būt, veikti funkcines kiaušialąstės savybes.

Tradiciškai vaisingumo sutrikimo priežastys yra hormoninės, genetinės, anatomicinės ar infekcinės kilmės. Tačiau dabar jau nustatyta, kad 40% nevaisingumo ir net 80% pasikartojančių persileidimų priežasčių yra būtent imuninės kilmės.

Folikuliniam skystyje esančios medžiagos dalyvauja kiaušialąsčių vystymėsi. Imunologiniai žymenys, tokie kaip gama interferonas (IFN- $\gamma$ ), svarbūs embriono implantavimosi potencialui nustatyti [2,3]. Taigi citokinų kiekio nustatymas folikuliniam skystyje galėtų būti reikšmingas tiriant tuos atvejus, kai embrionai nesiimplantuoja gimdoje.

Įrodyta, kad citokinai, tiek embrioninės tiek motininės kilmės, kontroliuoja implantavimosi procesą. Jų signalo perdavimo sutrikimai gali lemti embriono implantavimosi defektus. Todėl embriono - motinos dialogo analizė implantavimosi periodo momentu turėtų atverti naują pagalbinių apvaisinimo procedūrų etapą, paremtą šį procesą kontroliuojančių imunologinių žymenų išsamesniu tyrimu ir neinvazyvios embrionų atrankos, susijusios su išskiriamų į auginimo terpę molekulių nustatymu, sukūrimu.

Balansas tarp prouždegiminių ir antiuždegiminių citokinų gali lemti sėkmingą ar nesėkmingą nėštumo eigą. Uždegiminis atsakas su prouždegiminių citokinų produkcija yra būtinas implantacijos pradžiai: trofoblasto invazijai bei angiogenezės indukcijai. Bet netrukus po potencialiai žalingų uždegiminio atsako efektų, Th1 imuninis atsakas privalo būti nuslopintas antiuždegiminiais citokinais ir pereiti į Th2 sąlygotą imuninį atsaką.

Yra duomenų, kad ląstelių aktyvacijos ir diferenciacijos sutrikimai, citokinų produkcijos ir recepcijos, turi įtakos akušerinės ir perinatalinės patologijos išsivystymui[49]. Kaip matome mūsų tyrime, moterys, kurioms buvo nustatytos IFN- $\gamma$  koncentracijos padidėjimas, nepastojo. Panaudojus eksperimentinį vaisiaus vystymosi sutrikimo modelį, buvo įrodyta, kad šiuo atveju leukocitai akumuliuojami gimdos audiniuose. Kiti tyrimai byloja apie šiam modeliui būdingą augimo faktorių ir priešuždegiminių citokinų produkcijos pokyčius, palyginti su normalaus nėštumo vystymosi schema[49].

Paskutiniųjų metų tyrimai parodo, kad moters urogenitalinio trakto leukocitų išskiriamų citokinų vaidmuo neapsiriboja tik imuniniu atsaku ir gali būti suskirstytas į 4 sudedamąsias dalis:

1. embriogenezės reguliacija, dalyvauja daugelio organų, tame tarpe ir imuninės sistemos organų, vystymėsi;
2. dalyvauja normalių fiziologinių funkcijų reguliavime, pvz., normalios kraujodaros;
3. reguliuoja organizmo apsaugines funkcijas vietiniame ir sisteminame lygyje;

#### 4. reguliuoja regeneracijos procesus atstatant pažeistus audinius.

Vis dar neaiškūs lieka citokinų balanso pokyčiai embriono implantacijos periodu. Ankstyvųjų nėštumo etapų imuninis reguliavimas, tame tarpe folikulų brendimo, apvaisintos kiaušialąstės implantacijos, vis dar menkai ištirtas.

Šios problemos aktualumas nepaprastai didelis, bet vis tiek kol kas dar neaišku, kaip ankstyvuosiuose etapuose gestacinio periodo pasireiškia lokalus ir sisteminis leukocitų išskiriamų citokinų poveikis. Atskirų citokinų koncentracijų nustatymas kraujo serume ar folikuliniame skystyje, neišaiškinus jų biologinio vaidmens ne visada leidžia korektiškai įvertinti dominuojantį vaidmenį vienos ar kitos reguliuojančių faktorių grupės [49].

Domėjimasis moters reprodukcinės sistemos audiniuose esančių leukocitų išskiriamų citokinų reguliacijos vaidmeniu pradinuose reprodukcinio proceso etapuose, nėra tik teorinis, jis labai susijęs su poreikiu detaliai išsiaiškinti šią problemą klinikinėje praktikoje. *In vitro* apvaisinimo efektyvumas šiuo metu neviršija 35%, o apie trečdalį nėštumų nutrūksta pirmojo trimestro pradžioje. Detalus imuninės sistemos vaidmens ištyrimas leistų kurti naujus gydymo metodus, taikant dirbtinį apvaisinimą. Tikslinga paminėti, kad prieš taikant apvaisinimą *in vitro*, atliekamas hiperovuliacijos stimuliavimas, 5-10% atveju komplikuojasi į kiaušidžių hiperstimuliacijos sindromą, kurio patogenezėje pagrindinis vaidmuo tenka uždegimą stimuliuojantiems citokinams. Galima įtarti, kad citokinų koncentracijos ir jų biologinio vaidmens tyrimas folikuliniame skystyje galėtų pasitarnauti kiaušidžių hiperstimuliacijos sindromo prognostikoje.

## 6.IŠVADOS

1. Leukocitų skaičius folikuliniame skystyje sveikų ir nevaisingų moterų buvo panašus ir statistiškai nesiskyrė. Pirminio nevaisingumo atveju leukocitų buvo šiek tiek daugiau nei antrinio nevaisingumo atveju.
2. Nevaisingų moterų folikuliniame skystyje nustatytos leukocitų populiacijos: makrofagai, neutrofilai, limfocitai, audinių bazofilai (putliosios ląstelės) ir eozinofilai. Nevaisingų moterų folikuliniame skystyje nustatyta daugiau limfocitų ir mažiau neutrofilų nei sveikų moterų folikuliniame skystyje.
3. Nevaisingų moterų folikuliniame skystyje nustatėme IFN- $\gamma$  (11,5% tirtų atveju); nustatytas IFN- $\gamma$  gali būti netiesioginis nesėkmingos implantacijos rodiklis pirminio nevaisingumo atveju.

## **PADĖKA**

Nuoširdi padėka med.dr. Audronei Eidukaitei, kuri visada rasdavo laiko pasidalinti žiniomis, patardavo, iškilus sunkumams , o taip pat už jos neišsiamiamą kantrybę.

Dėkoju „Vaisingumo klinikos“ personalui už suteiktą tiriamąją medžiagą.

## SUMMARY

### **Investigation of the cell composition of the follicular liquid and the concentration of the interferon- $\gamma$ in infertile women**

The aim of this study was to determine and evaluate populations of leukocytes and the concentration of interferon- $\gamma$  in follicular liquid in infertile women. The tasks were set to reach the objective as follows: to determine and evaluate leukocyte count in follicular liquid in infertile women; to evaluate populations of leukocytes in follicular liquid in infertile women; to determine and evaluate concentration of interferon-  $\gamma$  in follicular liquid. Cells, present in the follicular liquid and cytokines they exude, are the object of the research. Women, from 25 to 37 years and who are planning an artificial impregnation procedure, take part in this study. Total leukocyte count of the best sample was measured using light microscope and Gorjaev chamber. Populations of leukocytes were analysed using light microscope and immersive system. Concentration of interferon-  $\gamma$  was determined using the immunoenzyme method. After the investigations were conducted, the data was statistically processed. The follicular liquid of 71 women was investigated. The studied women were divided into groups by character of ovulation and reason inducing their infertility; and there was also a group of women to whom the infertility was not diagnosed, their spouses were infertile. When investigating the follicular liquid of infertile women, the absolute leukocyte count was as follows:  $0.58 \pm 0.30 \times 10^6$  under normal ovulation;  $0.65 \pm 0.26 \times 10^6$  under abnormal ovulation;  $0.61 \pm 0.27 \times 10^6$  under primary infertility;  $0.69 \pm 0.35 \times 10^6$  under secondary infertility;  $0.58 \pm 0.31 \times 10^6$  those of healthy women. The number of leukocytes in the follicular liquid was similar in both healthy and infertile women, and the count statistical data did not differ. In case of primary infertility leukocyte count was slightly greater in comparison to secondary infertility. The populations of leukocytes established in the follicular liquid of infertile women were as follows: macrophagi, neutrophils, lymphocytes, tissue basophili (mast cells) and eosinophili. The number of lymphocytes established in the follicular liquid of infertile women was bigger and the number of neutrophils was smaller compared to numbers of lymphocytes and neutrophils in the follicular liquid of healthy women. The IFN- $\gamma$  (in 11.5% of the cases investigated) was detected in the follicular liquid of infertile women; the IFN- $\gamma$  detected may be indirect indicator of unsuccessful implantation in case of the primary infertility.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adashi E.Y. Reproductive endocrinology, surgery and technology. Lippincott – Raven publishers. Vol.2. 1996;28-36.
2. Adashi E.Y. The potential relevance of cytokines to ovarian physiology. *Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology*, 1992, 43;439-444.
3. Adomaitienė D., Januliavičiūtė N., Karakevičius R., Vaičiūnėnas V.. *Klinikinės imunologijos įvadas*. Kaunas. 2001;160-166,198,295,296.
4. Alila H.W., Hanzel W. Induction of lymphopenia causes luteal dysfunction in cattle. *Biology of Reproduction*, 1984, 31;671-678.
5. Arici A., Oral E., Bukulmez O. Monocyte chemoattractant protein-1 expression in human follicular fluid and ovarian cells. *Journal of Reproductive Immunology*, 1997; 201-219.
6. Arici A., Oral E., Bahtiyar O. Leukemia inhibitory factor expression in human follicular fluid and ovarian cells. *Human Reproduction*, 1997, 12;1233-1239.
7. Brannstrom M, Runesson E, Ivarsson K, Janson P. Gonadotropin and cytokine regulated expression of the chemokine interleukin-8 in the human preovulatory follicle of the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000;85(11):4387-95.
8. Brännström M., Norman R.J. Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Human Reproduction*, 1993, 8;1762-1775.
9. Белокриницкая Т.Е., Витковский Ю.А. Роль цитокинов в регуляции реакций иммунитета, гомеостаза и неспецифической резистентности у родильниц с послеродовыми эндометритами - Стр. 22.
10. Best C. L., Pydney J., Welch W.R., Burger N., Hill J.A. Localization and characterization of white blood cell populations within the human ovary throughout the menstrual cycle and menopause. *Human Reproduction*, 1996, 11, 790-797.
11. Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C. et al. Natural killer cells in antiviral defence: function and regulation by innate cytokines. *Ann. Rev. Immunol.*, 1999, 17;189-220.
12. Bukulmez O., Arici A. Leukocytes in ovarian function. *Human Reproduction Update*. 2000, Vol. 6 No.1; 1 – 15.



13. Castilla J.A., Sampaio A., Molina R.. Mononuclear cell subpopulations in human follicular fluid from stimulated cycles. *Am. J. Reprod Immunol*, 1990, 22, 127 – 129.
14. Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. The biology of human natural killer – cell subsets. *Trends Immunol*. 2001, 22; 633-640.
15. Croy, B.A., Ashkar, A.A., Minhas, K. and Greenwood, J.D. (2000) Can murine uterine natural killer cells give insights into the pathogenesis of preeclampsia? *J. Soc. Gynecol. Invest.*, 7, 12–20.
16. Čignėjienė V., Janickienė R., Sadauskas V., Tarnauskas E, Žukauskas J.. *Ginekologija*. Vilnius. 1990; 6 – 9, 14 – 25.
17. Dalton, D.K., Pitts-Meek, S., Keshav, S. et al. (1993) Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes [see comments]. *Science*, 259, 1739–1742.
18. Devoto L, Vega M, Kohen P, Castro A, Castro O, Christenson L.K, Carvallo P, Strauss J.F. Endocrine and paracrine-autocrine regulation of the human corpus luteum during the midluted phase. *Juornal Reproduction Fertil Suppl*. 2000. 55. 13-20.
19. Eidukaitė A.. Nėštumo imunologija. *Medicinos teorija ir praktika*. 2002. 4(32); 323-325.
20. Eidukaitė A., Tamošiūnas V.. Eozinofilų aktyvumas ir IgE koncentracija endometrioze sergančių moterų pilvaplėvės skystyje. *Medicinos teorija ir praktika*. 2002, 2(30); 94-96.
21. Eidukaitė A., Pukėnienė T., Tamošiūnas V.. Endometriumo makrofagai: aktyvacijos ir adhezijos molekulių ekspresija. *Medicinos teorija ir praktika*, 2002, 1[29]; 11-14.
22. Fasouliotis S.J., Spandorfer S.D., Witkin S.S., Schattman G., Liu H.C., Roberts J.E., Rosenwaks Z. Maternal serum levels of interferon-  $\alpha$  and interleukin-2 soluble receptor-  $\alpha$  predict the outcome of early IVF pregnancies. *Hum Reprod* 19 (2004), p.p. 1357-1363.
23. Gaytan F., Moralez C., Garsia – Parolo L., Reymundo C., Bellido C., Sanchez – Criado J.E. Macrophages, cell proliferation, and cell death in the human menstrual corpus luteum. *Biol. Reprod.*, 1998, 59; 417-425.
24. Givan AL, White HD, Stern JE et al. Flow cytometric analysis of leucocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. *Am J Reprod Immunol*. 1997, 38: 350-359.

25. Hans Frick, Benn Kummer, Reinhard Putz. Wolf – Heidegger's Atlas of Human Anatomy, 4 th, 1990, 303.
26. Hill JA, Anderson D, Polgar K. T helper 1 type cellular immunity to trophoblast in women with recurrent abortions. JAMA. 1995, 273: 1933-1938.
27. Hoek A., Allaerts W., Leenen P.J.M., Schoemaker J., Drexhage H.A. Dendritic cells and makrophages in the pituitary and the gonads. Evedence for their role in the fine regulation of the reproductive endocrine response. Europe Juornal Endocrinology, 1997, 136,8-24.
28. <http://medinfo.home.ml.org>
29. [www.lab.anhb.uwa.edu.au/.../Blood/blood.htm](http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/.../Blood/blood.htm)
30. <http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp>
31. Huang, S., Hendriks, W., Althage, A. et al. (1993) Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. Science, 259, 1742–1745
32. Hunt J.S., Robertson S. Unterine macrofihages and euvirmental proqraming for pregnancy success. Juornal Reproduction Imunology, 1996, 32, 1 – 25.
33. Jurgelionienė S., Šergalienė O.. Klinikinių laboratorinių tyrimų metodai. Vilnius, 1995; 89 – 94, 129 – 136.
34. Loke YW, King A. Immunology of implantation. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2000, 14: 827-837.
35. Matsumodo K., Appiah – Pipim J., Sehleimer R.P., Bickel C.A. CD44 and CD69 reprezent differnt types of cell – surface activation markers for eosinophiles. Am. Juornal Respir. Cell Mol. Biology, 1998, 18,60-66.
36. Murdoch WJ, McCormick RJ. Mechanisms and physiological implications of leucocyte chemoattraction into periovolatory ovine follicles. J Reprod Fertil. 1993Mar; 97(2):375-80.
37. Nishimuta R, Bowolakson A, Acosta I.J, Murakami S, Piotrowska K, Skarzynski D.J, Okuda K. Possible role of interleukin-1 in the regulation of bovine corpus luteum throughout the luteal phase. Biology Reproduction.2004.71(5).1688-93.
38. Orhan Bukulmez and Aydin Arici. Leukocytes in ovarian function.Human Reproduction Update. 2000, Vol. 6 No.1; 1 – 15.
39. Praškevičius A., Ivanovienė L., Stasiūnienė N., Burneckienė J., Rodovičius H., Lukoševičius L., Kondratas D.. Biochemija. KMU leidykla, Kaunas, 2003; 250-262.

40. Praškevičius A, Lukoševičius L, Burneckienė J, Rodovičius H, Dūdėnas H. *Hormonai*. Kaunas, 2002. 238.
41. Сидорова И.С., Овсянникова Т.В., Данилова О.С. Современный взгляд на иммунологические аспекты невынашивания беременности. [/media/gynecology/04\\_02/73.shtm](#). 2004.
42. Симбирцев А.С., Цитокины: классификация и биологические функции (Цитокины и воспаление. 2004. Т. 3, № 2. С. 16-22.)
43. Серова О.Ф., Федорова М.В., Полетаев Л.Б. Иммунологические аспекты невынашивания беременности. Вестник Российской Ассоциации акушеров-гинекологов. №3, 1999.
44. Simon C., Caballero – Campo P., Garsia – Valasko J.A., Pellicer A. Potential implications of chemokines in reproductive functions: an attractive idea. *Juornal Reproduction Immnology*, 1998, 38;169-93.
45. Srivastava, M.D., Lippes, J. and Srivastava, B.I. (1996) Cytokines of the human reproductive tract. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 36, 157–166.
46. Сотникова, Н.Ю. Кудряшова А.В., Крошкина Н.В., Панова И.А., Веденеева М.В., Гагаева Ю.В. (Цитокины и воспаление. 2006. Т. 5, № 1. С. 16-20.) Продукция цитокинов децидуальными макрофагами при физиологической беременности и синдроме задержки внутриутробного развития плода
47. Wegmann T.G., Lin H., Guilbert L. et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal – fetal relationship: is successful pregnancy a TH 2 phenomenon *Immunol Today* 14 (1993), p.p. 353- 356.
48. Zaleckas G.. *Pagrindinių laboratorinių tyrimų žurnalas*. Vilnius, 2002; 234-236.
49. Запертова Е.Ю., Радзинский В.Е., Бондаренко К.В., Союнов М.А. Провоспалительные цитокины и их роль в генезе привычного невынашивания беременности [media/gynecology/04\\_06/292.shtml](#) .17-Apr-2005

