

Matrices metalloproteināzes, interleikīns-10, tumoru nekrotiskais faktors- α , neuropeptīdi un apoptoze govju endometrijā pēcdzemdību periodā
Matrix Metalloproteinases, Interleukine-10, Tumor Necrosis Factor- α , Neuropeptides and Apoptosis in Cow Endometrium in Postparturition Period

Iga Šematoviča, Aleksandrs Jemeljanovs

LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskais institūts „Sigrā”
Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine „Sigrā”, LLU
e-mail: sigra@lis.lv

Māra Pilmane

Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūts
Institute of Anatomy and Anthropology, Riga Stradins University
e-mail: pilmane@latnet.lv

Abstract. Cow's uterus biopsy samples were taken in winter 2004/2005 at the research and training farm “Vecauce”. Histological investigations were performed at the Institute of Anatomy and Anthropology of Riga Stradins University. Nine cows were biopsied twice: in the first and fifth week of postparturition. The aim of the research was to reveal inflammatory factors, neuropeptide-containing innervations, and apoptosis in the endometrium of cows in postparturition period. The results showed significant increase in the number of inflammatory cells, TNF- α , and apoptotic cells in endometrium between first and fifth week after parturition ($p < 0.01$). A mild positive correlation was found between the number of apoptotic cells and macrophages in endometrium ($r = 0.54$; $p < 0.1$). In cow's endometrium, expression of MMP-2 was observed in macrophages, but it was not characteristic of processes in the cow's uterus in postparturition period. Compared to MMP-2 expression, MMP-9 expression was significantly higher ($p < 0.05$) and was characteristic of cow's uterus in postparturition. No statistically significant correlation was found between cells expressing IL-10, MMP-2, MMP-9, TNF- α , and PGP 9.5. A mild positive correlation ($r = 0.52$; $p < 0.05$) between the number of TNF- α positive cells and infiltration of endometrium with inflammatory cells was detected. A mild positive correlation ($r = 0.58$; $p < 0.05$) was observed between the number of TNF- α and apoptotic cells in the cows' endometrium. PGP 9.5 containing nerve fibers appeared around endometrial glands, walls of blood vessels, and in submucosal tissue and did not correlate with tissue infiltration by inflammatory cells, possibly due to the weakness of the immune system of individual animals.

Key words: cow's uterus in postparturition, matrix metalloproteinases, interleukine-10, tumor necrosis factor- α , protein gene product 9.5.

Ievads

Arvien aktuālāki kļūst pētījumi par bioloģiskajiem procesiem šūnās specifisku bioloģiski aktīvu vielu ietekmē, lai izprastu, prognozētu un vadītu pēcdzemdību perioda dzemdes involūcijas mikroprocesu norises gaitu un to ietekmējošo faktoru mijiedarbību.

Visi audu mikroprocesi saistās ar šūnu ekstracelulāro matrici (ECM), ar tās proteīniem un citām bioloģiski aktīvām vielām. Matrices metalloproteināzes (MMP) ir specifiski proteolītiski enzīmi, kas nodrošina un uztur ECM homeostāzi.

MMP un ar tām saistītie endogēnie inhibitori (TIMP – *tissue inhibitor of metalloproteinases*) kopā tiek apzīmēti par MMP sistēmu (MMPs). Pašlaik ir zināmi vairāk nekā 20 MMP pārstāvji (Kliem, 2006; Curry Jr and Osteen, 2001). Iekaisuma šūnas, īpaši makrofāgi, spēj sintezēt, uzkrāt un izdalīt MMP-2 un MMP-9. Ir zināms, ka makrofāgi spēj sekretēt vairāk nekā 100 dažādu vielu, piemēram, citokīnus, MMP, TIMP, augšanas faktorus un citus, tādā veidā modificējot ECM sastāvu dažādu procesu laikā.

MMP-2 (alternatīvi sauktas arī par 72 kDa želatināzi, želatināzi A, IV tipa kolagenāzi) substrāti

ir I, II, III, V, VII un X tipa kolagēns, elastīns, fibronektīns, želatīns un prokolagenāze-3. Savukārt MMP-9 (sauktas arī par 92 kDa želatināzi, želatināzi B) substrāti ir IV un V tipa kolagēns, elastīns un želatīns. Minētās vielas izdala dažādas organisma šūnas.

Viens no būtiskākajiem procesiem organismā un tieši govīm dzemdes involūcijas laikā ir apoptoze jeb programmētā šūnu nāve (PCD – *programmed cells death*). PCD ir ģenētiski noteikts, bioķīmiski specifisks šūnu nāves veids, kas iesākas ar specifiskiem signāliem un nelizosomālu endogēnu endonukleāžu aktivāciju, kā rezultātā šūnu kodola DNS tiek sašķelta fragmentos, atbrīvojot organismu no novecojušām, nevajadzīgām vai bojātām šūnām. Morfoloģiski PCD izpaužas ar atsevišķu haotiski novietotu šūnu nāvi. PCD inhibitori ir augšanas faktori, šūnu matrice, steroīdie hormoni, un dažu vīrusu olbaltumi. Savukārt PCD aktivatori ir: augšanas faktoru trūkums, saiknes ar matrici zaudēšana, glikokortikoīdi, daži vīrusi, brīvie radikāļi un jonizējošais starojums (Goyeneche and Telleria, 2005).

Interleikīni (IL) darbojas kā ķīmiski imūnsistēmas informācijas pārstāvji un piedalās hiperjutīguma un iekaisuma atbildes reakcijās, regulē T un B limfocītu aktivizāciju imūnatbildes reakcijas laikā uz antigēnu. Galvenais imūnregulējošo citokīnu avots organismā ir CD4⁺T šūnas, kas diferencējas T_H1 un T_H2 subpopulācijās. T_H2 šūnu un makrofāgu producētais IL-10 inhibē T_H1 šūnu producēšanu un makrofāgu funkcijas, bet T_H1 sekretē interferonu- γ (IFN γ), kurš aktivizē makrofāgus, inhibē B šūnas un ir toksisks atsevišķiem šūnu veidiem (Meyer and Harvey, 2004).

Aktivizēti makrofāgi producē citokīnu – audzēju nekrotisko faktoru alfa (TNF- α), kurš ir neglikozilēts proteīns ar 17 kDa molekulmasu. Ir zināms, ka TNF- α stimulē prostaglandīna sintēzi luteālajās šūnās un samazina gonodotropīnu inducētu progesterona producēšanu govju luteālajās šūnās. TNF- α inducē apoptozi un šūnu proliferāciju (Kliem, 2006).

Iekaisuma atbildes reakcija ir minimizēt kairinātāja efektu, un šis mehānisms darbojas arī govīs dzimumceļos pēcdzemdību periodā. Galvenā atbilde uz kairinātāju ir šķidrums un šūnu uzkrāšanās bojāto audu vietā ar mērķi norobežot bojāto apvidu. Tas ir aktīvs bioķīmisks process, kas ietver daudzas bioķīmiskas reakcijas ar funkcionālām un morfoloģiskām pārmaiņām. Viens no būtiskiem dzemdes morfoloģijas parametriem ir inervācijas izmaiņas dzemdes audos šajā periodā. To raksturo proteīngēnvielas (PGP 9.5) klātbūtne un tās daudzuma izmaiņas dažādu bioloģisku procesu mijiedarbībā dzemdes audos (Tingaker et al., 2006). PGP 9.5 ir citosolisks 24.8 kDa proteīns, kas pieder ubikvitīnai C-termināla hidrolāzes apakšklasei. Tā ir atrodama

mugurkaulnieku neironos un neuroendokrīnajās šūnās, kur ir aptuveni 1–5% no visiem šķīstošajiem proteīniem (Piccinini et al., 1996).

Latvijā līdz šim nebija veikti pētījumi par šūnu un to matricēs bioloģiju govīs dzemdē. Pētījuma mērķis bija izzināt iekaisuma faktoru un apoptozes izplatību govīs dzemdes audos pēcdzemdību periodā, kā arī savstarpēji korelēt minētās norises.

Materiāls un metodes

Pētījumā bija iekļautas deviņas Latvijas brūnās (LB) šķirnes govīs no LLU MPC „Vecauce” slaucamo govju ganāmpulka novietnes „Līgotnes” 2004./2005. gada ziemas periodā. Biopsijas paraugi no govju dzemdes ņemti pirmajā nedēļā pēc atnešanās un atkārtoti četras nedēļas pēc atnešanās ar oriģinālu biopsijas instrumentu, kas ražots uzņēmumā „Kruuse”, Dānija. Pēc iegūšanas audu paraugi ievietoti neitrālā 12% formalīna šķīdumā, pH 7.5 (Humason, 1967), kurā tie uzglabāti līdz izmeklēšanai Rīgas Stradiņa Universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūta Morfoloģijas laboratorijā. Rutīnai gaismas mikroskopijai ar gaismas mikroskopu „Leica BME” govju dzemdes audu paraugi tika atūdeņoti, attaukoti un ielikti parafīna blokos, pēc tam griezti ar mikrotomu un krāsoti ar eozīnu un hematoksilīnu (Aughey and Frye, 2001).

Imūnhistoķīmiski noteiktas matricēs metalloproteināzes-2 un -9 (MMP-2 un MMP-9, darba atšķaidījums – 1:100, „R&D”, Anglija), audzēju nekrotiskais faktors- α (TNF- α , darba atšķaidījums – 1:100, „Abcam”, Anglija), interleikīns-10 (IL-10, darba atšķaidījums – 1:400, „Abcam”, Anglija), proteīngēna peptīds 9.5 (PGP 9.5, darba atšķaidījums – 1:1600, „DakoCytomation”, Dānija) (Hsu et al., 1981). Apoptozes noteikšanai izmantojām TUNEL diagnostikas metodi (Negoescu et al., 1998). Datu statistiskajā apstrādē lietojām Stjudenta t testu vienas paraugkopas analīzei, Vilkinsona testu divu saistītu paraugkopu analīzei un divfaktoru un daudzfaktoru korelācijas analīzi (Arhipova un Bāliņa, 2003).

Rezultāti un diskusija

Govju endometrija histoloģiskie izmeklējumi parādīja statistiski nozīmīgu ($p < 0.01$) neitrofilo leikocītu, makrofāgu un limfocītu infiltrācijas palielinājumu laikā no pirmās līdz piektajai nedēļai pēc dzemdībām. Tas skaidrojams ar involūcijas procesu, kad dzemdes audos izzūd ar dzemdību procesu saistītā tūska, audi kļūst blīvāki un notiek dzemdību procesā radušās dzimumsistēmas infekcijas izskaušana, audu atjaunošanās un cikliskuma atsākšanās, kad savukārt novēro paaugstinātu polimorfonukleāro leikocītu aktivitāti. Infiltrācijas intensitāte starp atsevišķām

govīm variē, iespējams, inficēšanās pakāpes un individuālās imunitātes sprauguma dēļ (1. tabula).

Apoptotisko šūnu daudzums endometrija stromā no pirmās līdz piektajai nedēļai pēc atnešanās palielinājās par 30%, bet epitēlijā par 26%, pie kam pirmajā nedēļā pēc atnešanās tas bija līdzīgs

daudzumam epitēliālajās un stromas šūnās ($p>0.05$), bet četras nedēļas pēc atnešanās apoptotisko šūnu daudzums stromā bija lielāks nekā epitēliālajās šūnās ($p<0.01$) (1. att.). Apoptotisko šūnu koncentrācijas pieaugums dzemdes audu stromā varētu būt skaidrojams ar to, ka govys dzemde četras nedēļas pēc

1. tabula / Table 1

**Iekaisuma šūnu infiltrācija, apoptoze un bioloģiski aktīvas vielas govys endometrijā
1. un 5. nedēļā pēc dzemdībām**
**Inflammatory cell infiltration, apoptosis and biological substances in cow's endometrium in the
1st and 5th week postparturition**

Parauga Nr. / No. of a sample	Nedēļa / Week	Iekaisuma šūnas endometrijā / Inflammation cells in endometrium	Apoptoze endometrijā / Apoptosis in endometrium	MMP-9	MMP-2	IL-10	TNF- α	PGP 9.5
Tapa/F2	1.	3.3±2.73	34.5±3.20	+++	+	+	-	++
Tapa/1	5.	32.5±7.18	28.8±6.15	++	+	-	+	+++
Esma/F3	1.	14.7±7.63	25.2±3.15	+++	+	-	-	+
Esma/7	5.	45.2±32.02	63.2±1.50	++	+	+	+	+
Dakota/F4	1.	13.7±12.94	++	+	+	-	++
Dakota/3	5.	34.5±11.18	+++	+	+++	+++	+
Tērvete/F5	1.	15.0±4.20	30.2±5.50	++	+	++	-	-
Tērvete/2	5.	25.0±4.15	12.8±0.85	++	+	++	++	+
Vaida/F6	1.	23.7±8.36	14.0±0.30	+++	+	-	-	+
Vaida/6	5.	46.2±7.17	62.5±7.80	++	+	-	++	+
Okence/F7	1.	16.5±2.43	+	+	-	++	+
Okence/8	5.	19.3±13.87	74.0±14.35	+++	+	+	+++	+
Elba/F8	1.	11.2±7.19	+++	+	+	+	+
Elba/9	5.	29.3±6.02	++	+	+	+++	++
Akāce/F9	1.	27.2±4.02	++	+	-	++	+
Akāce/5	5.	29.5±4.76	++	+	-	+	+
Loda/F10	1.	4.8±1.19	21.6±28.85	++	+	+++	-	+
Loda/4	5.	45.3±13.06	23.8±4.00	++	+	++	++	+

Apzīmējumi: MMP – matrices metalloproteināze; IL – interleikīns; TNF – tumoru nekrotiskais factors; PGP – proteīngēni

- - nav MMP, IL, TNF- α , PGP 9.5 un apoptozes šūnās

+ - nedaudz šūnu satur MMP, IL, TNF- α un PGP 9.5

++ - vidējs daudzums šūnu satur MMP, IL, TNF- α un PGP 9.5

+++ - daudz šūnu satur MMP, IL, TNF- α un PGP 9.5

++++ - ļoti daudz šūnu satur MMP, IL, TNF- α un PGP 9.5

Notations: MMP – matrix metalloproteinasis; IL – interleukin; TNF – tumor necrosis factor;

PGP – protein gene product

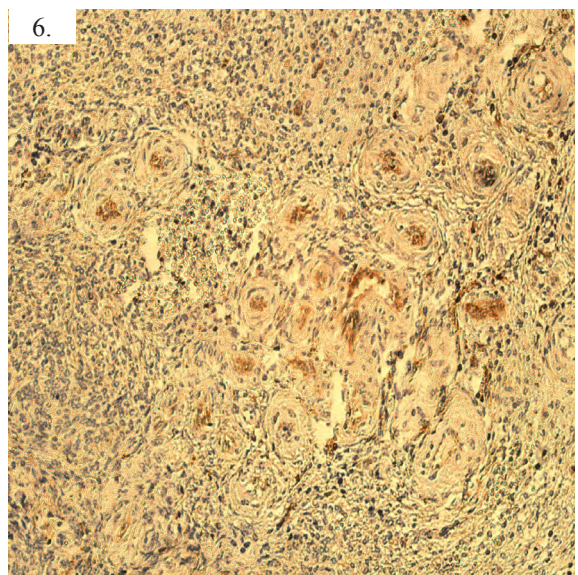
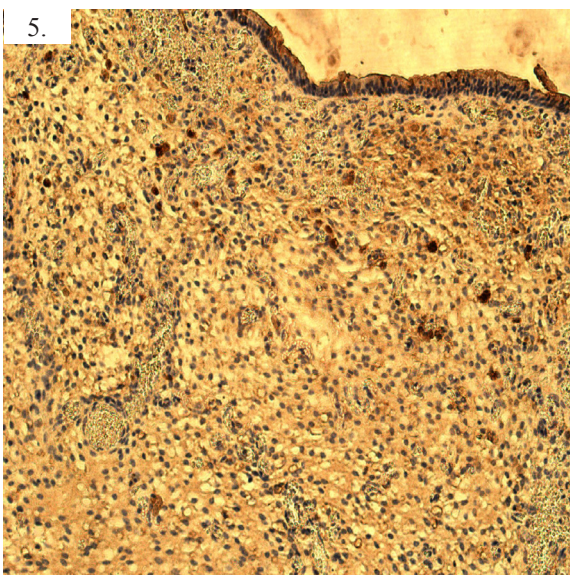
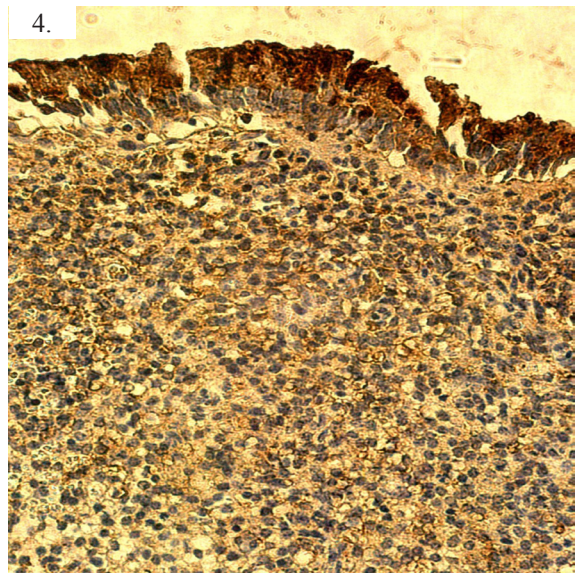
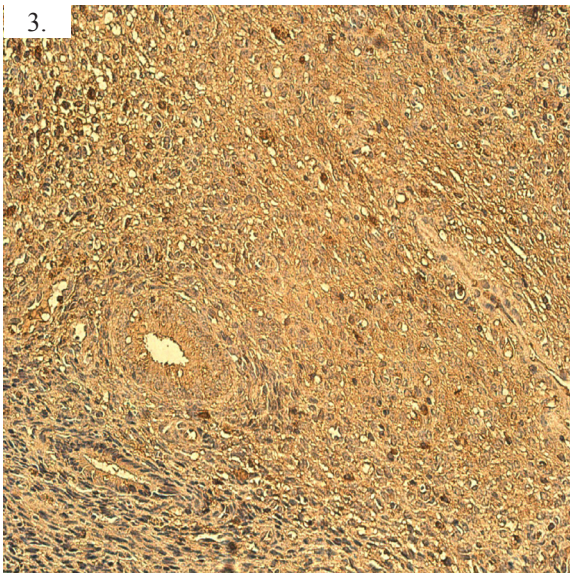
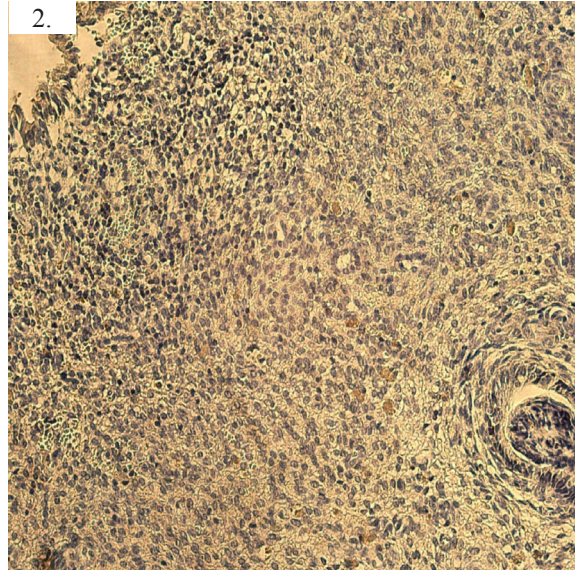
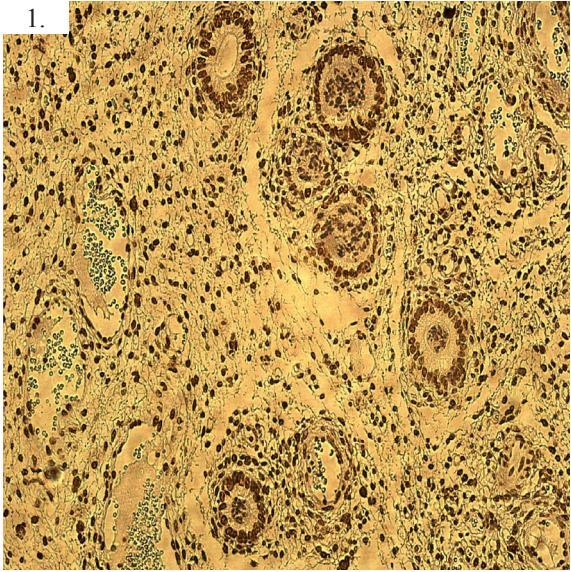
- - lack of MMP, IL, TNF- α , PGP 9.5, and of apoptotic cells

+ - small number of cells containing MMP, IL, TNF- α , and PGP 9.5

++ - moderate number of cells containing MMP, IL, TNF- α , and PGP 9.5

+++ - numerous cells containing MMP, IL, TNF- α , and PGP 9.5

++++ - significant number of cells containing MMP, IL, TNF- α , and PGP 9.5



atnešanās ir involūcijas noslēgumā, dzemdes audi ir kompakti un blīvi salīdzinājumā ar pirmo nedēļu, kad dzemdes siena vēl ir ļoti izstiepta un audos dominē tūska. Pētījums parādīja, ka govīm pēcdzemdību periodā kopumā pastāv būtiska ($r=0.92$; $p<0.01$) pozitīva korelācija starp PCD šūnu daudzumu stromā un epitēlijā. Apoptotiskajām šūnām bija vidēja pozitīva korelācija ar makrofāgu daudzumu endometrijā ($r=0.54$; $p<0.1$), ko var izskaidrot ar to, ka makrofāgi izdala TNF- α , kas ir viens no PCD inducētājiem (Zhdanov et al., 2003).

Makrofāgos vērojamā MMP-2 ekspresija govīs dzemdes audos nav raksturīga komponente norisēm pēcdzemdību periodā, kamēr šajā pašā laikā MMP-9 ekspresija govīs endometrija makrofāgos ir ievērojami lielāka ($p<0.05$) (2. un 3. att.). Iespējams, mūsu pētījumā atrastā MMP ekspresija galvenokārt endometrija dziedzeršūnās fagocitārajās šūnās saistāma ar specifisku šīs proteīnāzes aktivāciju.

IL-10 konstatējam šūnās ap virsmas epitēliju un zem tā, kā arī dziedzeršūnās (4. att.), kas atbilst citu autoru apgalvojumam, ka IL-10 izdala ne vien CD4⁺T šūnas, bet dzemdes audos to izdala arī endometrija dziedzeru un endometrija epitēlija šūnas (El-Sherif et al., 2001; Sallinen et al., 2000). Minēto autoru pētījumos IL-10 ekspresija saistīta nevis ar iekaisuma procesiem dzemdē, bet gan ar dzimumcikla fāzēm: IL-10 ekspresija palielinājās dzimumcikla sekretorajā fāzē, kā arī parādījās pēc medroksiprogesterona lietošanas. Tas, iespējams, izskaidro, kādēļ neatradām nevienu statistiski ticamu būtisku korelāciju saistībā ar IL-10 ekspresiju mūsu izmeklējumiem, jo mūsu pētāmiem dzīvniekiem būtiskākie bija dzemdes involūcijas un reģenerācijas procesi.

TNF- α daudzums bija būtiski ($p<0.001$) palielinājies, salīdzinot pirmo un piekto nedēļu pēc atnešanās, turklāt tas korelēja ($r=0.52$; $p<0.05$) ar iekaisuma šūnu infiltrācijas pakāpi endometrijā un ar PCD endometrija stromā ($r=0.58$; $p<0.05$) (5. att.). Šādu novērojumu var saistīt ar TNF- α kā fizioloģisku PCD inducētājfaktoru, jo, kā zināms, TNF- α un Fas-ligands (CD178) iesāk bioķīmisku reakciju kaskādi, kuras sekas ir hromosomu defragmentācija un šūnu nāve. Organisma šūnu virsmās ir speciāli TNF- α receptori TNF-RI un TNF-RII, bet Fas-ligandam receptori ir Fas/APO-1 (CD95). Minētie receptori ir līdzīgi pēc ekstracelulārā domēna cisteīna satura, kā arī receptora intracelulārās daļas. Saistoties TNF- α un Fas-ligandiem ar apoptozes receptoriem, aktivizējas intracelulārie šo receptoru t.s. „nāves domēni” (DED – *death effector domain*) DED, DED1, DED2 un citi starpnieki, ieskaitot keramīdus, proteīnu tirozīnkināzes, katepsīnu D u.c., kuri pārveda šūnu nāves signālu.

PGP 9.5 galvenokārt atradām nervšķiedrās endometrijā ap dziedzeriem, zemgļotādā un asinsvadu sienās (6. att.). Parasti iekaisuma procesā iekaisuma mediatori veicina nervu šķiedru veidošanos, bet atsevišķos gadījumos (četros no 18) šādu tendenci nenovērojam, jo pie augstas iekaisuma šūnu infiltrācijas PGP 9.5 imūnreaktīvās nervšķiedras neatradām. Jāatzīmē, ka paraugos, kuros nekonstatējam PGP 9.5, praktiski neatradām arī IL-10, kas varētu būt saistīts ar olnīcu darbības disfunkciju negatīvas enerģijas bilances periodā. Arī TNF- α daudzums šīm govīm bija salīdzinoši mazāks. Iespējams tādēļ arī konstatējam endometrijā PGP 9.5 un PCD vāju negatīvu korelāciju ($r=-0.25$; $p<0.1$), kas varētu būt saistīts ar atsevišķu dzīvnieku organisma imūnsistēmas vājumu pēcdzemdību periodā.

1. att. Apoptoze endometrija šūnās piektajā nedēļā pēc atnešanās (TUNEL, X 200).

Fig. 1. Apoptosis in endometrial cells in the fifth week postparturition (TUNEL, X 200).

2. att. MMP-2 ekspresija endometrijā piektajā nedēļā pēc atnešanās (MMP-2 IMH, X 250).

Fig. 2. Expression of MMP-2 in cow's endometrium in the fifth week postparturition (MMP-2 IMH, X 250).

3. att. MMP-9 ekspresija govīs endometrijā piektajā nedēļā pēc atnešanās (MMP-9 IMH, X 250).

Fig. 3. MMP-9 expression in the fifth week postparturition (MMP-9 IMH, X 250).

4. att. IL-10 ekspresija zem endometrija virsmas epitēlija un dziedzeršūnās (IL-10 IMH, X 400).

Fig. 4. Expression of IL-10 under epithelial cells and in glandular cells of endometrium (IL-10 IMH, X 250).

5. att. TNF- α ekspresija endometrijā piektajā nedēļā pēc atnešanās (TNF- α IMH, X 200).

Fig. 5. TNF- α expression in the fifth week postparturition (TNF- α IMH, X 200).

6. att. PGP 9.5 ekspresija nervšķiedrās ap endometrija dziedzeriem, asinsvadu sienās un zem epitēlija (PGP 9.5 IMH, X 200).

Fig. 6. PGP 9.5 expression in nerve fibers around endometrial glands, walls of blood vessels, and under epithelium (PGP 9.5 IMH, X 200).

Secinājumi

1. Govju endometrijā ir statistiski nozīmīga atšķirība ($p < 0.05$) starp TNF- α un apoptotisko šūnu sadalījuma relatīvo daudzumu pirmajā un piektajā nedēļā pēc dzemdībām.
2. Govju endometrijā pēcdzemdību periodā apoptotisko šūnu daudzums būtiski palielinās laikā no pirmās līdz piektajai nedēļai ($p < 0.05$), uzrādot vidēji pozitīvu korelāciju ar makrofāgu daudzumu endometrijā ($r = 0.54$; $p < 0.1$).
3. MMP-2 ekspresiju govju dzemdes audos pēcdzemdību periodā no pirmās līdz piektajai nedēļai atradām makrofāgos, bet tā nav raksturīga norisēm minētajā pēcdzemdību periodā. MMP-9 ekspresija šajā laikā govju dzemdes makrofāgos ir ievērojami lielāka ($p < 0.05$).
4. IL-10 ekspresija statistiski nozīmīgi nekorelē ar MMP-2, MMP-9, TNF- α , PGP 9.5 un iekaisuma šūnu infiltrāciju laikā no pirmās līdz piektajai nedēļai govju pēcdzemdību periodā.
5. TNF- α daudzums būtiski ($p < 0.001$) palielinās, salīdzinot pirmo un piekto nedēļu pēc atnešanās, turklāt tas korelē ($r = 0.52$; $p < 0.05$) ar iekaisuma šūnu infiltrācijas pakāpi endometrijā un endometrija apoptozi ($r = 0.58$; $p < 0.05$).
6. PGP 9.5 nervšķiedras raksturo endometrija dziedzeru sienas, zemgļotādu un asinsvadu sienas, bet to sadalījums nekorelē ar iekaisuma šūnu infiltrāciju, iespējams, individuālas dzīvnieka organisma imūnsistēmas vājuma dēļ.
7. Mikroinvolūcijas procesi govju endometrijā norit vēl piektajā nedēļā pēc atnešanās.

Literatūra

1. Arhipova, I., Bāliņa S. (2003) *Statistika Ekonomikā. Risinājumi ar SPSS un Mikrosoft Excel*. Rīga: Datorzinību centrs, 352 lpp.
2. Aughey, E., Frye F.L. (2001) *Comparative veterinary histology with clinical correlates*. Manson Pub.Ltd., London, 14-127.
3. Curry Jr, T.E., Osteen, K.G. (2001) Cyclic changes in the matrix metalloproteinases system in the ovary and uterus. *Biology of reproduction*, No. 64, pp. 1285-1296.
4. El-Sherif, A.M., Seth, R., Tighe, P.J., Jenkins, D. (2001) Quantitative analysis of IL-10 and IFN- γ mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. *Journal of pathology*, 195(2):179-85.
5. Goyeneche, A.A., Telleria, C. M. (2005) Exogenous estradiol enhances apoptosis in regressing post-partum rat corpora lutea possibly mediated by prolactin. *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 3:40.
6. Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H. (1981) The use of antiavidin antibody and biotin-streptavidin peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am. J. Clin. Pathol.*, 75: 816.
7. Humason, G.L. (1967) *Animal tissue techniques*. Second edition. W.H. Freeman and Company, San Francisco and London, 569 pp.
8. Kliem, H.S. (2006) *Investigations of extracellular matrix proteases, apoptotic and anti-apoptotic factors in the bovine corpus luteum. Inaugural-Dissertation*. Friedberg/Hessen, München, 150 pp.
9. Meyer, D.J., Harvey, J.W. (2004) *Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis*. Saunders, 351 pp.
10. Negoescu, A., Guillermet, Ch., Lorimer, Ph., Robert, C., Lantuejoul, S., Brambilla, E., Labat-moleur, F. (1998) TUNEL apoptotic cell detection in archived paraffin-embedded tissues. *Biochemica*, vol. 3, pp. 36-41.
11. Piccinini, M., Merighi, A., Bruno, R., Cascio, P., Curto, M., Mioletti, S. (1996) Affinity purification and characterization of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) from retina. *Biochemistry Journal*, 318:711-716.
12. Sallinen, K., Veräjänkorka, E., Pöllänen, P. (2000) Expression of antigens involved in the presentation of lipid antigens and induction of clonal anergy in the female reproductive tract. *Journal of reproductive immunology*, Vol. 46, No. 2, pp. 91-101.
13. Tingaker, B.K., Johansson, O., Cluff, A.H., Ekman-Ordeberg, G. (2006) Unaltered innervation of the human cervix uteri in contrast to the corpus during pregnancy and labor as revealed by PGP 9.5 immunohistochemistry. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 125 (1):66-71.
14. Zhdanov, A. V., Kurbanova, D.F., Davydova, M. P., Sosulina, L. Yu., Ezhova, L.S., Sukhikh, G.T. (2003) Apoptosis in fimbriae of fallopian tubes and endometrium in pyoinflammatory adnexal diseases. *Bulletin of experimental biology and medicine*, vol. 135, No. 2/Febr., pp. 150-153.