

КОЭКСПРЕССИЯ НЕКОТОРЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ВОСПРИИМЧИВОСТИ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА К ИМПЛАНТАЦИИ БЛАСТОЦИСТЫ

Л.М. Агаджанова

*Кафедра акушерства и гинекологии №1, ЕрГМУ,
Department of Obstetrics and Gynecology,
Huddinge University Hospital, Karolinska Institute, Sweden
375025, Ереван, ул. Корюна 2*

Ключевые слова: имплантация, эндометрий, бластоцисты

С развитием технологий вспомогательной репродукции пациенты, прежде считавшиеся безнадежно бесплодными вследствие ряда причин, получили возможность зачать. Завершающим этапом всех процедур метода экстракорпорального оплодотворения является подсадка эмбриона и имплантация бластоцисты. Сейчас хорошо известно, что успех имплантации зависит от идеального соответствия между эмбрионом и эндометрием. Важной проблемой до сих пор остается вопрос идентификации периода максимального соответствия между эмбрионом и восприимчивым эндометрием. Однако основным в этой готовности слизистой матки к имплантации является вопрос идентификации периода максимальной готовности слизистой матки к имплантации. Предложено много молекулярных и других маркеров восприимчивости эндометрия, но открытым пока является вопрос соотношения экспрессии разных маркеров друг с другом.

Фактор, ингибирующий лейкемию (ФИЛ), является секретируемым гликопротеином, впервые описанным как фактор, индуцирующий дифференциацию мышинных миелоидных лейкемических М1 клеток в макрофаги [1]. Было обнаружено, что у мышей с дефицитом ФИЛ гена процесс имплантации был нарушен несмотря на нормальное оплодотворение. Искусственное введение таким мышам рекомбинантного цитокина восстанавливало процесс имплантации [2]. У человека ФИЛ был обнаружен практически во всех тканях и клетках репродуктивной системы. Эти данные свидетельствуют об участии этого цитокина в репродуктивных процессах человека. Показано, что ФИЛ продуцируется человеческим эндометрием в течение всего менструального цикла [3,4]. Обнаружено также, что уровень ФИЛ значительно выше в секреторную фазу цикла, чем в пролиферативную [5]. С другой стороны, бластоциста имеет на своей поверхности специфический ФИЛ рецептор [5], свидетельствующий о возможном механизме взаимодействия между эмбрионом и материнскими тканями.

ми. Снижение уровня ФИЛ было обнаружено у женщин с бесплодием [6], что указывает на возможную важную роль цитокина в имплантации человека.

Не меньшее значение имеет изменение поверхностных ультраструктур эндометрия в период имплантации. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) поверхностного эпителия эндометрия мышей и крыс показала наличие эктоплазматических выпячиваний эпителиальных клеток во время так называемого имплантационного окна, получивших название пиноподий [7]. В человеческом эндометрии также было показано наличие пиноподий в середине лютеальной фазы [8]. Корреляция между наличием множественных пиноподий и последующими беременностями в циклах с использованием донорских яйцеклеток [9] предполагает важность пиноподий для имплантации. Неоднократно было высказано предположение, что определенное число неудач имплантации в ЭКО циклах связано с эмбриондometriальной асинхронией.

Исходя из вышеизложенного, нами было решено проследить экспрессию ФИЛ в эндометрии с наличием пиноподий, т.к. данных об этом в доступной литературе не имеется.

Материал и методы

Исследованию подверглись 30 здоровых женщин репродуктивного возраста от 25 до 40 лет (в среднем 32 года), с регулярным менструальным циклом 25–32 дня, которым была проведена хирургическая стерилизация маточных труб в Huddinge University Hospital, Sweden. Ни одна из женщин не принимала гормональных препаратов и не использовала внутриматочные средства по крайней мере за 3 месяца до исследования. Биопсии эндометрия были взяты в лютеальную фазу цикла, для времени взятия биопсии точкой отсчета считался день пика лютеинизирующего гормона (ЛГ), определяемого в моче. Биопсии были взяты между днями ЛГ+0 и ЛГ+13 и были поделены на две части – для СЭМ и для иммуногистохимического анализа.

Иммуногистохимический анализ. Нами были использованы залитые парафином образцы. Исследование проводилось по методике Cameron et al. [10]. Поликлональные козы антитела против человеческого ФИЛ были использованы в конечной концентрации 2 µg/ml (R&D Systems, Oxford, UK).

Сканирующая электронная микроскопия. Образцы для СЭМ были зафиксированы в специальном фиксативе, промыты и дегидрированы, затем высушены в специальной сушилке с CO₂, покрыты платиной и исследованы сканирующим электронным микроскопом Jeol 820.

Результаты и обсуждение

СЭМ исследование показало, что во всех образцах, взятых у женщин между днями ЛГ+6 и ЛГ+9, имеются пиноподии на разных стадиях своего развития. Биопсии были сгруппированы согласно наличию или отсутствию пиноподий и стадии их развития. Интенсивность экспрессии ФИЛ в различных клеточных структурах эндометрия представлена на рис.1.

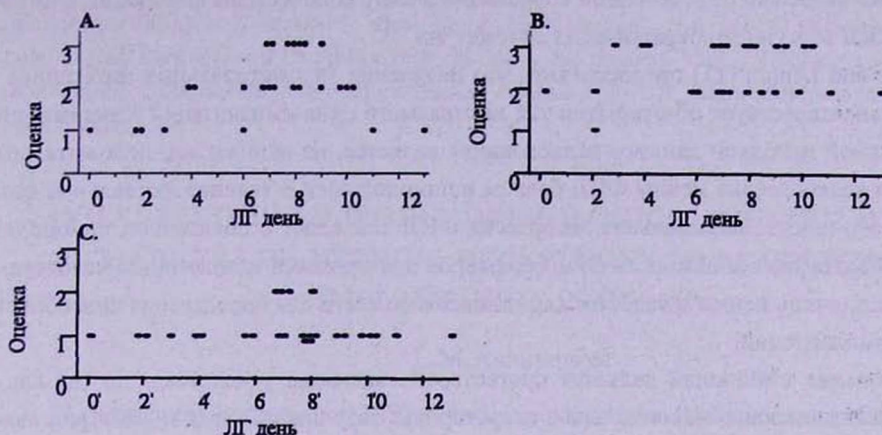


Рис.1 График шкалы интенсивности иммуногистохимического окрашивания ФИЛ белка для разного типа клеток эндометрия. Уровень экспрессии ФИЛ показан для поверхностного эпителия (А), железистого эпителия (В), стромы (С) в 23 образцах ткани. Каждая точка выражает среднюю интенсивность окраски, суммированную по результатам двух независимых "слепых" исследований.

Система оценки: 0 –нет окрашивания, 1–слабое, 2–умеренное, 3–интенсивное окрашивание.

В течение ЛГ дней 0–6 выделение ФИЛ поверхностными эпителиальными клетками эндометрия постепенно возрастало до пиковых значений. Клетки поверхностного и железистого эпителия выделяли максимальное количество ФИЛ в ЛГ дни 6–9, что совпадало с появлением и персистенцией пиноподий и, соответственно, с предполагаемым периодом восприимчивости эндометрия к имплантации бластоцисты. Более того, максимальная экспрессия ФИЛ белка в эпителии совпадала со стадией расцвета пиноподий (рис.2). После ЛГ дней 9–10 интенсивность окраски поверхностного эпителия уменьшалась и к ЛГ дню 13 была сходна с началом лютеальной фазы. В железистом эпителии наблюдалась аналогичная тенденция, с той лишь разницей, что интенсивность окраски была выше в течение всей лютеальной фазы. Клетки стромы показывали невыраженную экспрессию и накопление ФИЛ, за исключением нескольких образцов с умеренным окрашиванием в период рецептивности эндометрия (статистически недостоверно).

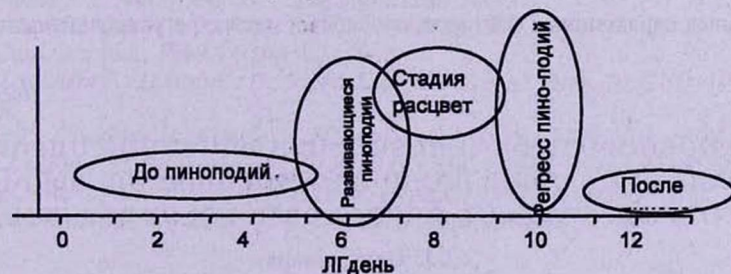


Рис.2 Схематическое распространение пиноподий в эндометрии в лютеальную фазу менструального цикла.

Не было выявлено определенной корреляции между количеством пиноподий и интенсивностью ФИЛ иммунного окрашивания эндометрия.

Sunder and Lenton [11] предполагают, что появление эндометриальных интегринов и пиноподий свидетельствует об открытии так называемого окна имплантации в эндометрии. Наиболее важной находкой данного исследования является, на наш взгляд, положительная корреляция и коэкспрессия между ФИЛ белком и пиноподиями. В течение лютеальной фазы менструального цикла максимальная экспрессия ФИЛ совпадает с появлением пиноподий, что еще раз подтверждает важность обоих маркеров для процесса имплантации человека, и они могут быть очень ценны в качестве скринингового теста для определения способности женщины к имплантации.

Образование пиноподий является прогестеронзависимым у человека, так же как и ФИЛ, экспрессия которого максимальна в секреторную фазу цикла, когда эндометрий находится под влиянием прогестерона. Экспрессия ФИЛ поверхностным эпителием предполагает его участие в процессе имплантации бластоцисты – аппозиции, адгезии и фиксации, тогда как более выраженное выделение фактора железистым эпителием подчеркивает его важную роль в предимплантационном развитии бластоцисты. Можно предположить, что ФИЛ выделяется в виде своей трансмембранной формы в полость матки, где он и взаимодействует с поверхностью бластоцисты. Ранее было показано, что человеческие эмбрионы в стадии предимплантации (бластоциста) имеют на своей поверхности специфические рецепторы к ФИЛ – LIF-R и gp130, кроме того ФИЛ также способствует лучшему развитию эмбриона *in vitro* [12]. Эктоплазматические выросты на поверхности эпителия эндометрия – пиноподии – визуализируются также чаще всего и световым микроскопом [13], однако СЭМ необходима для изучения ультраструктуры эндометрия, в частности, пиноподий. Кроме того, это единственный метод определения стадии развития пиноподий и дифференцировки их от других морфологических структур, что дает возможность с большей вероятностью датировать степень подготовленности эндометрия к имплантации.

Итак, интенсивность экспрессии ФИЛ зависит от дня менструального цикла и типа клеток эндометрия и в эпителии имеет циклический характер.

Таким образом, фактор, ингибирующий лейкемию, по всей видимости, является одним из потенциальных паракринных факторов, способных местно регулировать имплантацию.

Поступила 15.09.01

ԱՐԱՍՏՈՑԻՍՏԻ ԻՄՊԼԱՆՏԱԾԻՍՏԻ ՆԿԱՏՄԱՐԱ ՄԱՐԳՈՐ
ԷՆԴՈՄԵՏՐԻՈՐՄԻ ԸՆԿԱԼՈՒՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇ ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՐ ԵՎ
ՍՈՐՖՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԳՈՐԾՈՆՆԵՐԻ ՎՈՒՋՍՊԵՐՄԱՆ

L.Մ.Աղաջանովա

Որպես մարկերներ, որոնք պայմանավորում են էնդոմետրիումի պատրաստակամությունը բնատույնի իմպլանտացիայի նկատմամբ, առաջադրվել են էնդոմետրիալ արգելակող գործոն (ԼՊԳ) և պինոպոդիաներ՝ էնդոմետրիումի մակերեսի վրա: Մեր

կողմից քայքայում է ԼՊՔ-ի էքսպրեսիայի և մադոու ենդոմետրիումի մակերեսի վրա պինոպոդիումների առկայության միջև եղած կորելյացիան, ընդ որում, ցիտոկինի մաքսիմալ էքսպրեսիան համընկնում էր պինոպոդիայի ծաղկման շրջանի հետ և, համապատասխանաբար, բլաստոցիտի իմպլանտացիայի նկատմամբ ենդոմետրիումի ընկալունակության ենթադրվող շրջանի հետ:

COEXPRESSION OF SOME MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR MARKERS OF UTERINE RECEPTIVITY TO BLASTOCYSTS IMPLANTATION IN HUMAN

L.M.Aghajanova

Leukemia inhibitory factor (LIF) as well as pinopodes on the endometrial surface have been suggested to play an important role in human implantation process. Our aim was to determine the detailed cell-type specific expression of LIF and LIF receptor (LIF-R) protein in pinopodes of endometrium from healthy fertile women.

Our results revealed that in scanning electron microscopy (SEM) all samples obtained from women during LH days 6-9 had pinopodes on different developmental stages. Luminal and glandular epithelial cells expressed maximal levels of LIF on LH days 6-9, coinciding with the appearance of pinopodes and supposed period of uterine receptivity for blastocyst implantation. Before and after pinopodes the LIF immunostaining was less intense or faint.

The positive coexpression between pinopodes and LIF protein indicates the importance of both the cytokine and pinopodes for human implantation process and allows any of them to be used for a screening test for implantation potential.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gearing D.P., Gough N.M., King J.A. et al. EMBO J. 1987;20;6(13):3995.
2. Stewart C.L., Kaspar P., Brunet L.J. et al. Nature, 1992,3, 359(6390):76.
3. Arici A., Engin O., Attar E., Olive D.L. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1995, 80(6),1908.
4. Kojima K., Kanzaki H., Iwai M. et al. Biol. Reprod., 1994,50:882.
5. Charnock-Jones D.S., Sharkey A.M., Fenwick P., Smith S.K. J. Reprod. Fertil., 1994,101:421.
6. Hambartsoumian E. Am. J. Reprod. Immunol., 1998,39:137.
7. Psychoyos A., Mandon P. J. Reprod. Fertil., 1971b,26:137.
8. Nikas G. Hum. Reprod., 1999,14(suppl.2):99.
9. Nikas G., Drakakis P., Loutradis D., Mara-Skoufari C. et al. Hum. Reprod., 1995, 10(5):1208.
10. Cameron S.T., Critchley H., Buckley C.H. et al. Fertil. Steril., 1997,67(6):1046.
11. Sunder S., Lenton E.A. Baillieres Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol., 2000,14(5):789.
12. Sargent I.L., Martin K.L., Barlow D.H. Hum. Reprod., 1998,13(suppl.4):239.
13. Develioglou O.H., Nikas G., Hsiu J.G., et al. Fertil. Steril., 2000,74:767.