

Гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста и пиноподии, их корреляция в человеческом эндометрии

Л.М. Агаджанова, А. Ставреус-Эверс

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

Ключевые слова: эндометрий, гепаринсвязывающий эпидермальный фактор, пиноподии

Гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста (НВ-EGF) принадлежит к семейству эпидермальных факторов роста (EGF) и существует в виде двух биологически активных форм: трансмембранной и зрелой растворимой формы, происходящей от мембранно-связанного предшественника. НВ-EGF является потенциальным стимулятором клеточной пролиферации, миграции и подвижности и секретируется широким спектром клеток. НВ-EGF продуцируется в матке свиней, мышей, крыс и людей. Была показана его способность экспрессироваться во время периода имплантации у мышей [3], связываясь с EGF рецепторами [7]. Предложены различные теории, объясняющие возможную роль НВ-EGF во время имплантации. Во-первых, он способствует росту и дифференциации бластоцисты [14], во-вторых, его трансмембранная форма способствует адгезии бластоцисты к стенке матки, в-третьих, НВ-EGF опосредует экспрессию интегринов и может играть роль в процессе инвазии трофобласта как хемоаттрактант. Показана временная экспрессия НВ-EGF у человека в период восприимчивости эндометрия к имплантации бластоцисты [2]. В середине секреторной фазы НВ-EGF присутствует на апикальной поверхности клеток поверхностного и железистого эпителия [19] и в строме в конце фазы пролиферации, а также в начале беременности в децидуальных клетках и трофобласте [8]. НВ-EGF оказывает стимулирующий эффект на развитие человеческого эмбриона, что особенно наглядно проявляется на 8-клеточной стадии [16].

Сканирующая электронная микроскопия поверхностного эпителия эндометрия мышей и крыс показала наличие эктоплазматических выпячиваний эпителиальных клеток во время так называемого имплантационного окна, получивших название пиноподий [13]. Они были предложены в качестве ультраструктурных маркеров имплантации [12]. В человеческом эндометрии также было показано наличие пиноподий в середине лютеальной фазы. Более того, существование их четко ограничено во времени, и во всех циклах

(нормальных, стимулированных и на фоне заместительной гормональной терапии) пиноподии присутствуют не дольше 48ч. Серия биопсий выявила стадии последовательного развития пиноподий: стадия развивающихся пиноподий, стадия расцвета и стадия регресса [11]. Существование пиноподий совпадает по времени с открытием так называемого имплантационного окна, когда эндометрий является наиболее восприимчивым к имплантации бластоцисты. Положительная корреляция между наличием множественных пиноподий и последующими беременностями в циклах с использованием донорских яйцеклеток [12] предполагает важность пиноподий для имплантации. Однако до сих пор остается дискуссионным вопрос о конкретной роли пиноподий. Предполагается, что определенные факторы (факторы роста, адгезивные молекулы), необходимые для начала процесса имплантации, могут выделяться пиноподии-формирующими клетками (или адгезироваться на поверхности пиноподий) для облегчения контакта между бластоцистой и эндометрием.

Цель работы состоит в выявлении корреляции между экспрессией НВ-EGF в различных клеточных структурах эндометрия и наличием пиноподий на поверхности эндометрия, т.к. эти данные в доступной литературе отсутствуют.

Материал и методы

Исследованию подверглись 30 здоровых женщин репродуктивного возраста 25-40 лет (в среднем 32 года), имеющих регулярный менструальный цикл 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 от-

Таблица 1

Количество биопсий, день после пика ЛГ и стадии развития пиноподий

Пиноподии	Дни после пика ЛГ	Количество биопсий
До пиноподий	ЛГ+0 до ЛГ+4	n=5
Развивающиеся пиноподии	ЛГ+6 до ЛГ+8	n=6
Расцвет пиноподий	ЛГ+8 до ЛГ+9	n=6
Регресс пиноподий	ЛГ+9 до ЛГ+10	n=3
После пиноподий	ЛГ+10 до ЛГ+13	n=3

счета 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 сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и для иммуногистохимии.

Иммуногистохимический анализ

Нами были использованы залитые парафином образцы. Исследование проводилось по методике Leach et al. [8]. Поликлональные козы антигены против человеческого HB-EGF были использованы в конечной концентрации 10 мкг/мл (R&D Systems, Oxford, UK). Негативный контроль был инкубирован с неиммунизированным козым IgG (SDS, Falkenberg, Sweden). В качестве вторичного антитела был использован биотинизированный кроличий антикозий IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Сканирующая электронная микроскопия

Образцы для СЭМ были зафиксированы в специальном фиксаторе, промыты и дегидрированы, затем высушены в специальной сушилке с CO₂ (critical point drier), 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 присутствию или отсутствию пиноподий и стадии их развития (табл.1).

Интенсивность экспрессии HB-EGF в различных клеточных структурах эндометрия представлена на рисунке и в табл. 2.

Иммуноокрашивание HB-EGF было обнаружено в цитоплазме. Окрашивание HB-EGF в поверхностном эпителии и строме до появления пиноподий было слабым. Интенсивность окраски повышалась в присутствии пиноподий, что особенно четко было выражено в стадии их расцвета. После пиноподий экспрессия HB-EGF в поверхностном эпителии уменьшается. В железистом эпителии наблюдалась аналогичная тенденция,

но с менее интенсивной окраской в течение всей лютеальной фазы. Иммуноокрашивание стромы варьировало между разными образцами, но не зависело от дня менструального цикла. В кровеносных сосудах экспрессия HB-EGF наблюдалась без циклических вариаций. Не было выявлено определенной корреляции между количеством пиноподий и интенсивностью HB-EGF иммунного окрашивания эндометрия.

Интересной и важной находкой в этом исследовании было выявление тесной взаимосвязи между развитием пиноподий и экспрессией HB-EGF. HB-EGF выделяется в небольших количествах в течение нормального менструального цикла [8], однако интенсивное иммуноокрашивание HB-EGF, в особенности поверхностного (люминального) эпителия, совпадающее с наличием пиноподий, подчеркивает важность как последних, так и HB-EGF для процесса имплантации.

Данные об усилении экспрессии HB-EGF во время имплантации, полученные нами, соответствуют данным литературы [8,19], свидетельствующим, что HB-EGF и HB-EGF mRNA выделяются в период имплантации у женщин, подвергшихся гистерэктомии по поводу лейомиомы или шеечной патологии. Было высказано предположение о *de novo* синтезе HB-EGF в период имплантации [19]. Однако было также показано, что женщины с наличием лейомиомы имеют пониженную продукцию HB-EGF в секреторном эндометрии по сравнению со здоровыми женщинами [1]. Поэтому в этом исследовании в качестве доноров эндометрия нами были выбраны здоровые женщины репродуктивного возраста.

Уоо с соавторами [1] продемонстрировали экспрессию HB-EGF в "выростах эндометрия наподобие ресничек", однако не было прослежено, каким образом они коррелируют с пиноподиями. Пиноподии на поверхности эпителия эндометрия визуализируются при помощи светового микроскопа, однако при этом за пиноподии могут быть ошибочно приняты некоторые другие структуры [4]. Поэтому в данном исследовании мы использовали технику сканирующей электронной микроскопии с целью подтверждения присутствия на поверхности эндометрия, а также для опреде-

Распределение экспрессии HB-EGF в различных клеточных структурах эндометрия и корреляция со стадией развития пиноподий

Образец	Группа	Поверхностный эпителий	Железистый эпителий	Строма
	до пиноподий	++	+	++
2		++	+/++	+/+
3		+/++	+	++
4		+	+	+
5		++	+	+
6		++/+	+/++	+
7	развивающиеся пиноподии	+++	++	+
8		++	++	++/+
9		+++	+++	++
10		++/+++	++	+/++
11		++/+++	++/+++	++
12		+++	++	+/++
13	расцвет пиноподий	++/+++	++/+++	++
14		+++	++	+/++
15		++	++	+
16		+++	++	+
17		+++	++	++
18		+++	+++	++
19	регресс пиноподий	+++	+++	++
20		+++	++	++
21		+++	+++	++
22	после пиноподий	++	++	+
23		++/+++	++	+/++
24		++	++	+

ления стадии развития пиноподий. Прогестерон и его рецептор вовлечены в процесс регуляции формирования пиноподий [4,17] и экспрессии HB-EGF [8]. Это отражает важность прогестерона для регуляции HB-EGF и пиноподий и соответственно для процесса имплантации в целом.

У крыс и людей HB-EGF оказывает влияние на преимплантационное развитие эмбриона [10]. На апикальной поверхности мышинного эмбриона в период имплантации транслоцируется ErbB4 рецептор, связывающий HB-EGF [15,18]. Соответственно материнский HB-EGF является важным субстратом для развития эмбриона.

HB-EGF вовлечен также в процессы резпитализации при заживлении повреждений [9]. Основываясь на этом, можно предположить, что эта способность HB-EGF необходима для заживления поверхности эндометрия в месте имплантации после пенетрации клеток трофобласта сквозь эпителий.

Обобщая полученные данные, можно сказать, что интенсивная экспрессия HB-EGF в клетках поверхностного эпителия и на их поверхности в период восприимчивости эндометрия к имплантации blastocysts предполагает его необходимость для процесса имплантации и, вероятно, HB-EGF выполняет различные функции в этом процессе. Можно предположить сле-

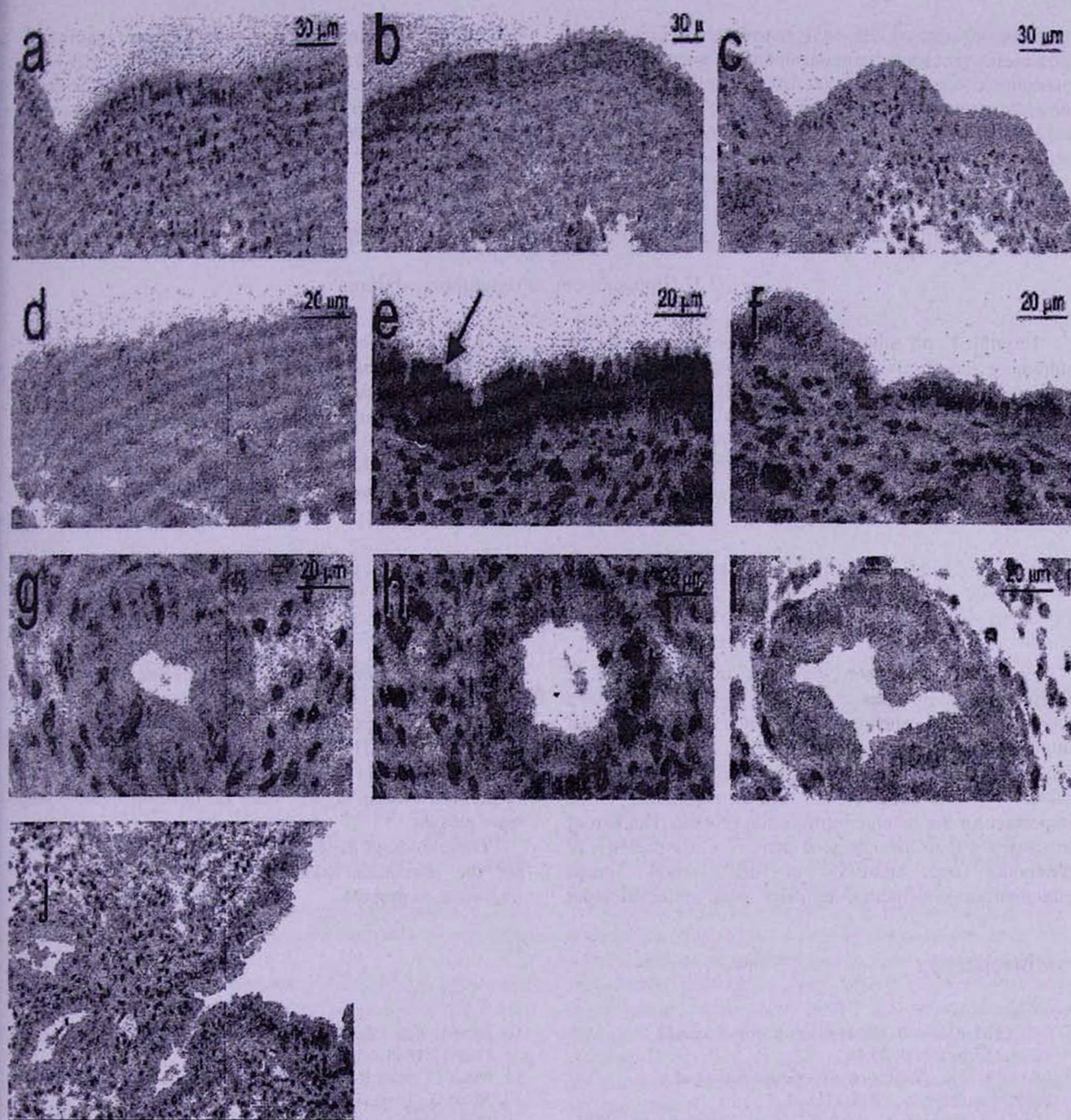


Рис. Интенсивность экспрессии HB-EGF в различных клеточных структурах секреторного эндометрия. Иммуноокрашивание поверхностного эпителия эндометрия до появления пиноподий—а, во время пиноподий—в, после пиноподий—с (ув. $\times 10$). Экспрессии HB-EGF при увеличении $\times 40$ до появления пиноподий—д, во время пиноподий—е, после пиноподий—ф. Стрелкой указано присутствие HB-EGF в пиноподиях. Иммуноокрашивание железистого эпителия эндометрия до появления пиноподий—г, во время пиноподий—и, после пиноподий—і (ув. $\times 10$). j—негативный контроль (ув. $\times 10$).

дующее: во-первых, HB-EGF протеолитически высвобождается из своей трансмембранной формы для связывания с бластоцистой; во-вторых, HB-EGF может воздействовать во время фазы адгезии бластоцисты как трансмембранный фактор пиноподий; и, в третьих, HB-EGF играет роль в процессе фазы пенетрации

бластоцисты. Данное исследование свидетельствует, что иммуногистохимическое определение HB-EGF может быть использовано в качестве маркера имплантационного окна в практической деятельности экстракорпорального оплодотворения.

Поступила 14.01.02

Աճի էպիդերմալ հեպարին կապող գործոնը և պինոպոդիաները մարդու էնդոմետրիումում

Լ.Մ.Աղաջանովա, Ա.Ստավրես-Էվերս

Հայտնի է, որ պինոպոդիաները հանդիսանում են արգանդի ընկալունակության մշակակիրներ: Սակայն մինչ այժմ պարզ չէ, թե մարդու էնդոմետրիումում որ գործոններն են պինոպոդիաների հետ ենթարկվում կոտրապրեսիայի: Էնդոմետրիումի սեկրետոր փուլում հեպարին կապող EGF-մման աճի գործոնը (HB-EGF) արագորեն աճում է, ինչը կարևոր է մարդկանց մոտ

ինպլանտացիայի ընթացքի համար: Հաստատված է, որ HB-EGF էքսպրեսիան, լյուինալային և գեղձային էպիթելիում զարգացող պինոպոդիաների առկայության դեպքում, ամենաբարձրն է: Դա հաստատում է այն փաստը, որ մարդկանց մոտ ինպլանտացիայի ընթացքում HB-EGF կարևոր է ինչպես ամրացման, այնպես էլ ներթափանցման փուլերում:

Heparin-binding epidermal growth factor and pinopodes in human endometrium

L.M. Aghajanova, A. Stavreus-Evers

Pinopodes have been suggested to be markers of uterine receptivity. However, it has not been yet shown which factors are coexpressed with the pinopodes in the human endometrium. Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) is increasingly expressed in the secretory phase endometrium and is considered to be important for the human implantation process. The aim of this study was to investigate if there is a coexpression of pinopodes and HB-EGF in the normal human endometrium. Endometrial biopsies were obtained from

fertile women with regular menstrual cycles. The biopsies were examined by scanning electron microscopy for detection of pinopodes and by immunohistochemistry for the expression of HB-EGF protein.

The expression of HB-EGF in luminal and glandular epithelium was the highest when the developed pinopodes were present.

These findings suggest that HB-EGF is important both for the attachment and penetration stages in human implantation process.

Լիտերատուրա

1. Ali AFM, Fateen B., Ezzet A. et al. Obstetrics and Gynecology, 2000, 95:49.
2. Birdsall M.A., Hopkisson J.F., Grant K.E. et al. Mol.Hum.Reprod., 1996, 2(1):31.
3. Das S.K., Wang X.N., Paria B.C. et al. Development, 1994, 120(5):1071.
4. Develioglu O.H., Hsiu J.G., Nikas G. et al. Fertil. Steril., 71:1040.
5. Develioglu O.H., Nikas G., Hsiu J.G. et al. Fertil. Steril., 2000, 74:767.
6. Giudice L.C. Hum. Reprod., 1999, 14(suppl.2):3.
7. Lim H., Das S.K., Dey S.K. Dev. Biol., 1998, 204(1):97.
8. Leach R.E., Khalifa R., Ramirez N.D. et al. J. Clin. Endocrin. Metab., 1999, 84:3355.
9. Marikovsky M., Vogt P., Eriksson E. et al. J. Invest. Dermatol., 1996, 106:616.
10. Martin K.L., Barlow D.H., Sargent I.L. Hum. Reprod., 1998, 13:1645.
11. Nikas G. Hum. Reprod., 1999, 14(suppl.2):99.
12. Nikas G., Drakakis P., Loutradis D., Mara-Skoufari C. et al. Hum. Reprod., 1995, 10(5):1208.
13. Psychoyos A., Mardon P. J. Reprod. Fertil., 1971b; 26:137.
14. Raab G., Kover K., Paria B.C. et al. Develop., 1996, 122:637.
15. Raab G., Klagsbrun M. Biochim. Biophys. Acta, 1997, 1333:F179.
16. Sargent I.L., Martin K.L., Barlow D.H. Hum. Reprod., 1998, 13 Suppl 4:239.
17. Stavreus-Evers A., Nikas G., Sahlin L. et al. Fertil. Steril., 2001, 76: 782.
18. Wang J., Mayernik L., Schulz J.F., Armant D.R. Develop., 2000, 127:33.
19. Yoo H.J., Barlow D.H., Mardon M.H. Dev. Gen., 1997,