

Received: 2005.10.25
Accepted: 2006.01.30
Published: 2006.02.08

Implantacja a antygenowość ludzkiego endometrium

Implantation and antigenicity of human endometrium

Alicja Halbersztadt¹, Jarosław Pająk¹, Przemysław Nowicki², Irena Jałocha³,
Marian Stanisław Gabryś¹

¹ II Katedra Ginekologii i Położnictwa Akademii Medycznej we Wrocławiu,

² Katedra i Klinika Kardiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu,

³ Studenckie Koło Naukowe przy II Katedrze Ginekologii i Położnictwa Akademii Medycznej we Wrocławiu

Streszczenie

Powstanie połączenia między zarodkiem i matką warunkuje dalszy jego rozwój. Pierwszym etapem tego procesu jest implantacja, wydarzenie wysoce skoordynowane, w którym uczestniczy zarówno blastocysta jak i endometrium doczesnowe. Blastocysta może przylegać do endometrium jedynie podczas „okna implantacyjnego”, kiedy macica staje się „receptywna”. Celem omówienia jest opis molekularnych wydarzeń zachodzących w „receptywnym” endometrium.

Podczas fazy wydzielniczej endometrium syntetyzuje cytokiny, takie jak: czynnik hamujący białaczkę LIF (leukemia inhibitory factor), nabłonkowy czynnik wzrostu wiążący heparany HB-EGF (heparin binding epithelial growth factor), transformujący czynnik wzrostu α (TGF- α – transforming growth factor α) i wyspecjalizowane struktury powierzchniowe, na przykład integryny. Istnieją dwa typy integryn: zależne od fazy cyklu i wydzielane konstytucyjnie. Współwystępowanie integryn zależnych od fazy cyklu może wyznaczać okres „okna implantacyjnego”. Endometrium płodnych i niepłodnych kobiet może różnić się ekspresją integryn. Niedostateczna ekspresja integryn może być spowodowana niewydolnością fazy lutealnej. Ważną rolę w procesie implantacji odgrywają E-kadheryna i alfa-krystalina B. Pinopodia obecne na komórkach endometrialnych podczas „okna implantacyjnego” wyznaczają okres optymalnej receptywności. Obecność wszystkich tych czynników określa unikalne właściwości endometrium podczas „okna implantacyjnego”.

Słowa kluczowe:

okno implantacyjne • endometrium • integryny • kadheryny • krystalina

Summary

It is essential for an embryo's further development that it generate a connection with the mother. The first stage of this process is implantation, a highly coordinated event that involves both embryonic and endometrial participation. A blastocyst may attach to the endometrium only during the “implantation window”, when the uterus is receptive. A description of the molecular features of a receptive endometrium is the aim of this review.

During the secretory phase, the endometrium synthesizes such cytokines as LIF (leukemia inhibitory factor), HB-EGF (heparin-binding epithelial growth factor), and TGF- α (transforming growth factor α) as well as special surface structures, such as integrins. There are two types of integrins: cycle dependent and constitutionally expressed. The coexpression of cycle-dependent integrins may mark the “implantation window”. The endometrium of fertile and infertile women may vary in expression of the integrins. Insufficient synthesis of integrins may be caused by a luteal phase deficiency. E-cadherin and alpha-crystallin B play an important role during im-

plantation. The expression of pinopodes on endometrial cells during the "implantation window" marks optimal uterine receptivity. The composition of all the factors mentioned above define the unique properties of the endometrium during the "implantation window".

Key words: implantation window • endometrium • integrins • cadherins • crystallin

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/8740.pdf

Word count: 3239

Tables: –

Figures: –

References: 28

Adres autorki: lek.med. Alicja Halbersztadt, Klinika Ginekologii AM, ul. Dyrekcyjna 5/7, 50-588 Wrocław;
e-mail: alicja.halbersztadt@interia.pl

Wykaz skrótów: **CRF** – czynnik uwalniający kortykotropinę (corticotropin-releasing factor); **DECs** – komórki endotelium doczesnego (decidual endothelial cells); **FAK** – kinaza miejsca przylegania (focal adhesion kinase); **HB-EGF** – nabłonkowy czynnik wzrostu wiążący heparany (heparin binding epithelial growth factor); **hCG** – ludzka gonadotropina kosmówkowa (human chorionic gonadotropin); **ICAM** – molekula adhezji międzykomórkowej (intercellular adhesion molecule); **IL** – interleukina (interleukin); **IVF** – zapłodnienie pozaustrojowe (*in vitro* fertilization); **IVF-ICSI** – mikroiniekcja plemnika do komórki jajowej (intracytoplasmic sperm injection); **LGL** – limfocyty zawierające duże ziarnistości (large granular lymphocytes); **LIF** – czynnik hamujący białaczkę (leukemia inhibitory factor); **MMP** – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej (matrix metalloproteinase); **PECAM-1** – molekula adhezji płytkowo-śródbłonkowej (platelet endothelial cell adhesion molecule-1); **TCS** – komórki trofoblastu (trophoblast cells); **TGF** – transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor); **VCAM** – molekula adhezji do śródbłonka naczyń (vascular cell adhesion molecule); **VLA** – (very late antigens) bardzo późne antygeny (very late antigens).

Proces implantacji ludzkiej blastocysty w endometrium jest jednym z bardziej frapujących zjawisk fizjologii. O doniołości tego procesu świadczy kilka faktów. Błona śluzowa trzonu macicy stanowi tkankę, której jedyną funkcją jest zapewnienie prawidłowego zagnieżdżenia się blastocysty i umożliwienie dalszego jej rozwoju, aż do porodu. Zjawisko implantacji, gdyby zostało zrozumiane i do końca zbadane, jest modelem rozpoznania i tolerancji dwóch genetycznie – tylko częściowo identycznych, a antygenowo – obcych tkanek. Pamiętając o powyższych twierdzeniach spróbujemy dokonać przeglądu aktualnej wiedzy dotyczącej tego tematu.

W 1976 roku Psychos [21] ustanowił i upowszechnił dwa pojęcia, pierwsze „receptywności endometrium” (endometrial receptivity) i drugie pojęcie „okienka implantacyjnego” (implantation window). W okresie okołoinplantacyjnym doczesnowo zmieniona błona śluzowa trzonu macicy ma pewne szczególne własności antygenowe. Przywykło się sądzić, że antygeny te, będące w większości związkami z grupy białek adhezyjnych, służą do fizycznego przytwierdzenia się blastocysty do apikalnych części komórek endometrium. Realizując swą funkcję, endometrium pomiędzy 19–22 dniem cyklu przybiera konstelację antygenową, która jest celem przemian, jakie w endometrium dokonywały się od początku cyklu miesięczkowego. Lopata [18] poddał w wątpliwość teorię endometrialnej receptywności. Zaproponował i częściowo udowodnił tezę, iż poza własnościami adhezyjnymi, które nie są najważniejsze w procesie implantacji, antygenowa mozaika, a także se-

kreca pewnych mediatorów stanowi zestaw regulatorów, przeprowadzających blastocystę przez zjawiska składające się na proces zagnieżdżenia.

Sukces, czy niepowodzenie ludzkiej prokreacji zależą od zdolności wytworzenia ścisłego połączenia matka- płód na poziomie molekularnym w złożonym, podlegającym licznym oddziaływaniom regulacyjnym procesie implantacji blastocysty do odpowiednio przygotowanej błony śluzowej macicy podczas wczesnych, krytycznych dla rozwoju zarodka dni.

Celem naszego opracowania jest scharakteryzowanie własności komórki endometrialnej w okresie okołoinplantacyjnym oraz prześledzenie procesu implantacji.

Podstawowym warunkiem prawidłowego rozwoju zarodka jest wytworzenie selektywnego połączenia między nim a matką. Tym połączeniem u człowieka jest trofoblast, a następnie rozwijające się zeń łożysko. Powstanie łożyska poprzedzone jest procesem implantacji blastocysty, w którym aktywnie uczestniczą doczesna i blastocysta. Chronologicznie proces ten przebiega w trzech etapach:

- apozycji blastocysty,
- adhezji blastocysty, która wchodzi w ścisły kontakt z powierzchni nabłonka macicznego,
- inwazji trofoblastu i penetracji komórek zarodka pomiędzy komórki doczesnej.

Proces ten zaczyna się około siedmiu dni po owulacji. Uczestniczą w nim zarówno komórki zarodka, jak i wszyst-

kie komponenty tkanki endometrialnej, tj. nabłonek gruczołowy (jednowarstwowy walcowaty), elementy blaszki właściwej błony śluzowej: naczynia krwionośne, składniki macierzy pozakomórkowej i komórki macierzowe.

Trofoblast łączy się z endometrium za pomocą różnych cząstek adhezyjnych, a poszczególne etapy tych interakcji są jakby wysublimowanym dialogiem receptorowym. Wyróżniamy następujące grupy molekuł adhezyjnych, obecnych w tkance doczesnowej i uczestniczących w tym dialogu:

- cząsteczki immunoglobulinopodobne, np. ICAM, VCAM,
- integryny,
- selektyny,
- kadheryny – odpowiedzialne głównie za kontakty między komórkami nabłonkowymi [8].

Integryny to glikoproteiny obecne na powierzchni komórek, biorące udział w takich zjawiskach jak gojenie ran, procesy immunologiczne, a także procesy rozrodcze [8,14]. Są one odpowiedzialne za wzajemną adhezję komórek między sobą i adhezję komórek z białkami macierzy pozakomórkowej, będąc heterodimerami zbudowanymi z dwóch połączonych łańcuchów α i β . Ich złożona struktura molekularna, wyrażona kombinacją ośmiu podjednostek β i czterech podjednostek α , zapewnia funkcjonalną swoistość, różnorodność i uniwersalność. Wiele integrynowych receptorów rozpoznaje swoiste ligandy, obecne zarówno na powierzchni komórkowej, jak i w obrębie przedziału (kompartementu) pozakomórkowego – w macierzy pozakomórkowej. Opisaną, najczęściej rozpoznawalną przez integryny sekwencją, jest sekwencja peptydowa: arginina-glicyna-kwas asparaginowy (RGD) [23]. Wiadomo również, że wiele integryn może wiązać się z kilkoma różnymi ligandami, a swoisty ligand może być rozpoznawany przez więcej niż jedną integrynę [9].

Integryny zatem umożliwiają przyleganie komórek do składników macierzy pozakomórkowej, ułatwiają ruch komórek, pośredniczą w oddziaływaniach i interakcjach międzykomórkowych. W procesach rozrodczych odgrywają istotną rolę podczas zapłodnienia, umożliwiając oddziaływanie plemnika z komórką jajową, implantację blastocysty – warunkując jej przyleganie do nabłonka doczesnowego, oraz wnikanie w endometrium komórek trofoblastu.

Interakcje między zewnątrzkomórkową domeną integrynową a ligandem w macierzy pozakomórkowej wywołują kaskadę zmian biochemicznych i molekularnych. Domeny cytoplazmatyczne integryn nie mają aktywności enzymatycznej, a zatem procesy aktywacyjne zależą od bezpośredniej lub pośredniej ich interakcji z komórkowym inicjatorem kaskady sygnałowej, np. z kinazą tyrozynową [12]. Opisane dotychczas mechanizmy aktywacyjne realizują się przez:

- wpływ na cytoszkielet,
- wytwarzanie wtórnego przekaźnika (jony wapnia, aktywujące wiele enzymów, zarówno kinaz, jak i fosfataz),
- aktywację kinaz białkowych, spośród których najlepiej poznana jest kinaza miejsca przylegania – FAK (focal adhesion kinase) [8,14],
- indukcję ekspresji genów, dzięki której integryny pośredniczą w regulacji procesów proliferacji i różnicowania komórkowego [9].

Endometrium w czasie cyklu miesięczkowego przejawia odmienne właściwości adhezyjne. Tabibzadeh i wsp. wykazała immunohistochemicznie – w 1992 r. – ekspresję różnych integryn w poszczególnych kompartmentach endometrium proliferacyjnego. Ekspresję tę stwierdzili na komórkach nabłonka powierzchniowego i gruczołowego, w obrębie macierzy pozakomórkowej oraz na komórkach śródłonka naczyniowego [25]. Niektóre integryny, np.: $\alpha 1 \beta 1$, αv i $\beta 3$ są eksponowane na powierzchni komórek nabłonka endometrialnego w zależności od fazy cyklu miesięczkowego. W okresie zmian proliferacyjnych integryna $\alpha 1 \beta 1$ nie jest eksponowana przez komórki nabłonka endometrialnego, podczas gdy w fazie lutealnej intensywność jej ekspozycji w obrębie części przypodstawnej komórek nabłonka gruczołowego i błonowego znamienne wzrasta [10]. Analogicznie zaobserwowano wyraźny wzrost ekspresji integryny αv (receptora fibronektyny) na powierzchni komórek nabłonka endometrium, począwszy od późnej fazy proliferacyjnej, aż do fazy lutealnej. Natomiast $\beta 3$ integryna ma wyraźny wzór ekspresji powierzchni nabłonkowej po 19 dniu cyklu [14]. Aplin i wsp. donieśli o obecności $\beta 5$ podjednostki w odcinku wierzchołkowym (apikalnym) cytoplazmy komórek, zarówno gruczołowych, jak i błonowych endometrium. Co ciekawe, badacze ci udowodnili, że ekspresja tejże podjednostki integrynowej nie zależy od fazy cyklu [2].

Przedział czasowy maksymalnej receptywności endometrium dla implantacji ludzkiej blastocysty, określanym mianem „okna implantacyjnego”, dotyczy okresu między 19 a 22 dniem cyklu.

Progesteron i estrogeny są odpowiedzialne za uformowanie struktury błony śluzowej trzonu macicy, występującej w okresie „okna implantacyjnego”. Po drugim wyrzucie estrogenów, pokrywającym się z momentem owulacji, endometrium zaczyna syntetyzować następujące cytokiny: LIF (czynnik hamujący białaczkę), TGF- α (transformujący czynnik wzrostu), HB-EGF (nabłonkowy czynnik wzrostu wiążący heparany) i amfiredulinę [5]. Ekspresja genu kodującego HB-EGF jest wyraźna w komórkach endometrialnych w miejscu inwazji trofoblastu. Ponadto, błona śluzowa trzonu macicy, która uległa przemianie ciążowej, ulega pogrubieniu i zawiera znaczne ilości makrofagów i leukocytów o charakterystycznym wyglądzie, z dużymi ziarnistościami w cytosolu (large granular lymphocytes – LGL) i niezwykłych właściwościach, takich jak: brak antygeny CD16, obecność antygeny CD56 (NCAM); podobnie do komórek NK [5]. Znaczącą rolę w procesie implantacji odgrywają cytokiny wytwarzane nie tylko przez komórki układu immunologicznego, ale również przez komórki nabłonka endometrialnego i podścieliska doczesnej, cytosyncytiotrofoblastu. Wydzielana przez trofoblast interleukina 1 (IL-1), która stymuluje takie przemiany, jak wzrost aktywności aromatazy, uwalnianie CRF, hCG, czy gelatynazy B, może mieć również wpływ na ekspresję integryn, analogicznie do zjawiska obserwowanego w procesach zapalnych, tzn. wpływu interleukin na ekspresję adhezyn w śródłonku naczyń krwionośnych. Stwierdza się również rosnącą ekspresję IL-6, TGF- β i LIF wytwarzanych zarówno przez komórki endometrium, komórki podścieliska, jak i elementy samego zarodka. Immunobarwienie wykazało, że immunoreaktywność IL-6 jest słabo wyrażona w fazie proliferacyjnej, natomiast jest silna w fazie lutealnej. Jej ekspresja na powierzchni komórek endome-

trialnych była podobna. Immunoreaktywność rosła podczas fazy lutealnej i osiągała maksimum podczas „okna implantacyjnego”. W późnej fazie lutealnej była zaznaczona tylko w górnej części zrębu. Wyniki te zostały potwierdzone za pomocą testów Western-blot [27].

Ekspresja integrzyn przebiega według dwóch wzorców: zależnego od fazy cyklu i konstytucyjnego. W dotychczasowych badaniach nad ekspresją cząstek integrynowych w tkance endometrialnej wykazano jednoznacznie niezależną i dynamiczną ich ekspozycję podczas cyklu menstruacyjnego. A udowodnione nasilenie tej ekspresji – jedynie w okresie maksymalnej „receptywności” endometrium – wskazuje na ich rolę w implantacji. Podobnie, jak synchroniczna czasowo utrata innych molekuł adhezji komórkowej wskazuje na to, że część procesu implantacji może również stanowić utratę barier komórkowych podczas inwazji trofoblastu. Proces implantacji może zatem wymagać obecności niektórych integrzyn, na przykład $\alpha v \beta 3$ – zarówno na endometrialnych, jak i zarodkowych komórkach nabłonkowych. Obserwacja ta potwierdza rolę integrzyn jako receptorów powierzchni komórkowej, uczestniczących we wzajemnym rozpoznawaniu komórek [16].

Na powierzchni komórek endometrialnych pojawiają się także integrynowe podjednostki $\alpha 2$ i $\alpha 3$. Lessey wraz z zespołem badawczym [14] wykazali, że podjednostka $\alpha 1$ jest obecna na komórkach nabłonkowych w fazie lutealnej (dzień 15–28). Podjednostka $\alpha 4$ pojawia się na początku i w środku fazy lutealnej. Podjednostka $\alpha 3$ i integryna $\alpha v \beta 3$ pojawiają się tylko w środkowej części fazy lutealnej. Wszystkie 3 podjednostki $\alpha 1$, $\alpha 4$ i $\beta 3$ wykazują wspólną ekspresję w ściśle określonym czasie, tj. między 20 a 24 dniem cyklu, co odpowiada domniemanemu „oknu implantacyjnemu”.

Tabibzadeh i wsp. [26] badając ekspresję podjednostek integrynowych od $\alpha 1$ do $\alpha 6$ zaobserwowali, że maksimum ekspresji integryny $\alpha 1 \beta 1$ występuje tuż po owulacji, a w środku fazy lutealnej dla integryny $\alpha 4 \beta 1$.

Można porównać ekspresję integrynową błony śluzowej trzonu macicy kobiet płodnych i niepłodnych. Klentzeris i wsp. [10] wykazali, że integryny $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$, i $\alpha 3 \beta 1$ są jednakowo ekspozowane u kobiet płodnych i niepłodnych, ale integryna $\alpha 4 \beta 1$ (VLA-4) jest obecna tylko u kobiet płodnych. Z integryną $\alpha 4 \beta 1$ łączą się pobudzone limfocyty B oraz T – przez adresynę VCAM, natomiast niepobudzone, łączą się przez selektynę L i integrynę $\alpha 4 \beta 7$ [8]. Poprzez domenę integrynową $\alpha 4 \beta 1$ jest wiązana fibronektyna płodowego trofoblastu w okresie „okna implantacyjnego”. Zatem nieobecność tejże struktury uniemożliwia właściwą interakcję komórkową maczyno-płodową, zaburzając przebieg procesu implantacji [10].

Integryny $\alpha v \beta 3$ i $\alpha 4 \beta 1$ rozpoznają fragment RGD (Arg-Gly-Asp), obecny m.in. na fibronektynie, witronektynie (białku S) i czynniku von Willebranda [8,14]. Fragment ten musi być obecny w obrębie ligandu. Z kolei integryny z podrodziny $\beta 1$ wiążą białka macierzy pozakomórkowej, takie jak kolagen, lamininę, fibronektynę i witronektynę. Ciekawym faktem jest obecność integrzyn i lamininy zarówno na endometrium, jak i na trofoblaście, co może świadczyć o wzajemnym wiązaniu [5,24].

Endometrium syntetyzuje glikoproteiny wiążące siarczan heparanu i inne molekuly substancji pozakomórkowej. Podjednostki $\alpha 6$ i $\beta 4$ mogą być składnikami receptora lamininy, która jest główną komponentą błony podstawnej endometrium (dodatkowo jej synteza jest zwiększona w okresie „okna implantacyjnego”), a także trofoblastu [5].

Lanteri i wsp. [13] wykazali, że poziom ekspresji podjednostek integrzyn $\alpha 6$ i $\beta 4$ na powierzchni endometrium rośnie w fazie lutealnej i jest wysoki w czasie „okna implantacyjnego”. Być może świadczy to o udziale tej integryny w pierwszych stadiach implantacji i penetrowaniu doczesnej. Natomiast poziom ekspresji wymienionych podjednostek w warstwie gruczołowej jest wysoki w czasie przedimplantacyjnym i maleje przed „oknem implantacyjnym”, natomiast w okresie poimplantacyjnym jest ponownie wysoki. Sugeruje to znaczącą rolę w kształtowaniu przestrzennych wiązań w warstwie gruczołowej w fazie proliferacyjnej i w czasie formowania łożyska.

Nie jest pewne, jaką rolę odgrywają integryny w procesie implantacji, ale ich ekspresja wyznacza okres „okna implantacyjnego”. Nieprawidłowa ekspresja jest częsta wśród kobiet z niewyjaśnioną przyczyną niepłodności. Przykładowo Meyer i wsp. [19] ocenili immunohistologicznie obecność integrzyn u kobiet niepłodnych, u których stwierdzono wodniaki jajowodów i porównali ją z ekspresją integrzyn u kobiet płodnych w czasie „okna implantacyjnego”. Poziom ekspresji integrzyn $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 1$ był podobny, tylko poziom integryny $\alpha v \beta 3$ był obniżony. Co ciekawe, w większości przypadków po skutecznym leczeniu operacyjnym poziom ekspresji integryny $\alpha v \beta 3$ był podobny, jak w grupie kontrolnej. Podobne różnice w ekspresji integrzyn występują u kobiet z defektem fazy lutealnej. Względny brak lub niedobór progesteronu w fazie lutealnej wiąże się z brakiem ujemnego sprzężenia zwrotnego i w rezultacie z dużą liczbą jądrowych receptorów progesteronu. Po leczeniu liczba receptorów obniża się a ekspresja integrzyn wraca do normy [17]. Może występować również obniżona ekspresja podjednostki $\beta 3$ [15].

Proces implantacji może być podobny do przechodzenia limfocytów przez naczynia w procesie zapalnym [5]. Oba procesy charakteryzuje wzrost przepuszczalności naczyń, rekrutacja komórek odpornościowych i wydzielanie cytokin. Sama implantacja może się dokonywać podobnie do wiązania i przechodzenia limfocytów do ogniska procesu zapalnego. Najpierw odbywa się ona za pośrednictwem lektyn wiążących węglowodany, później jest stabilizowana przez integryny. Endometrium ludzkiej macicy ma właściwości adhezyjne jedynie w okresie „okna implantacyjnego”. W tym okresie może syntetyzować nowe rodzaje struktur powierzchniowych, lub aktywować już istniejące [5].

Spośród mechanizmów immunologicznych, wyjaśniających maczyną tolerancję na płodowy allograft, zwraca uwagę mechanizm supresorowy interakcji z zaangażowaniem doczesnych limfocytów T (CD4+ i CD8+), których aktywacja jest modulowana przez IL-2, związaną na powierzchni komórkowej przez swoiste receptory (IL-2R α , CD25). Aby wyjaśnić mechanizm odpowiedzialny za regulację IL-2R α Chao i Ho stworzyli *in vitro* dwukulturowy model zmieszanych autologicznie, obwodowo akty-

wowanych limfocytów i trofoblastu kosmkowego. W tak skonstruowanym modelu zaobserwowano możliwość obniżenia ekspresji IL-2R α na maczynych limfocytach T przez wzrost uwalniania rozpuszczalnej postaci IL-2R α z powierzchni komórkowej (SIL-2R α). Interesujące jest to, że ilość uwalnianych postaci SIL-2R α jest zmienna i podlega wybiórczej regulacji enzymatycznej, m.in. przez inhibitory proteaz. W tym samym projekcie badawczym ujawniono w tkance kosmkowej – techniką immunohistochemiczną – wyraźną ekspresję metaloproteinaz macierzowych, zwłaszcza MMP-1, -2, -3, -7, i 9. Autorzy ci sugerują wpływ metaloproteinaz macierzowych na immunomodulację płodowo-macicznej powierzchni przylegania przez obniżenie ekspresji IL-2R α na limfocytach doczesnowych, a tym samym obniżenie ich zdolności proliferacyjnej i cytotoksycznej [4].

Wzajemne interakcje płodowo-maciczne prawdopodobnie modyfikują również lokalne środowisko implantacji, umożliwiając rozwój zarodka i „receptywną” przemianę endometrium. Te interakcje międzykomórkowe polegają na bezpośrednim kontakcie nabłonka endometrialnego z elementami trofektodermy oraz poprzez mediatory miejscowe.

Istnienie rozpuszczalnych czynników wydzielanych przez ludzką blastocystę, powodujących wzrost receptywności endometrium nie zostało dotychczas udokumentowane. Niedawno udowodniono jednak wpływ wysokiej jakości zarodków ludzkich – stosowanych w zapłodnieniu pozaustrojowym – na miejscowy stan endometrium przed wytworzeniem połączenia endometrialno-trofektodermalnego [25]. Sakkas i wsp., wykorzystując zarodki stosowane do programów leczenia niepłodności IVF i ICSI – z użyciem metody RT-PCR – wykazali indukcję ekspresji genu HOXA10 w komórkach Ishikawa (hodowla nabłonkowych komórek endometrialnych), wykluczając jednocześnie udział w tym procesie gonadotropiny kosmówkowej (hCG). Eksperyment ten dowiódł istnienia czynnika wytwarzanego przez ludzkie zarodki zaangażowanego w sygnalizację płodowo-macyczną i prawdopodobnie odpowiedzialnego za indukcję zmian endometrialnej receptywności [25].

Inną cząsteczką adhezyjną, która odgrywa szczególną rolę w tkance nabłonkowej jest kadheryna – śródbłonowa glikoproteina o masie 120 kDa, przewodząca sygnały przez kanały zależne od wapnia. Dawood i wsp. [6] badając ekspresję tej molekuly wykazali, że E-kadheryna jest ekspozowana na komórkach endometrialnych przez cały cykl, ale poziom jej mRNA rośnie w fazie lutealnej. Biorąc pod uwagę, że endometrium macicy przejawia właściwości adhezyjne tylko w czasie „okna implantacyjnego” możliwe jest aktywowanie połączeń adhezyjnych po owulacji np. przez progesteron. Badacze udowodnili również, że estrogeny obniżają poziom mRNA E-kadheryny. Możliwa jest dysfunkcja E-kadheryny przy defektach fazy lutealnej i względnym niedoborze progesteronu [6]. Bulla wraz z zespołem badawczym, próbując wyjaśnić molekularny mechanizm kolonizacji doczesnowych tętnic spiralnych przez płodowy cytotrofoblast w I trymestrze ciąży, w stworzonym modelu dwukulturowym komórek trofoblastu (trophoblast cells-TCs) i komórek endotelium doczesnowego (decidual endothelial cells-DECs) potwierdzili – wykorzystując mikroskop elektronowy – że TCs przylegają do DECs i migrują po-

przez połączenia międzynałonkowe. Ponadto dokonując analizy immunohistochemicznej wykazali silną ekspresję kadheryny endotelium naczyniowego (vascular-endothelial VE-cadherin) i molekuly adhezyjnej (platelet endothelial cell adhesion molecule-1 PECAM-1) w miejscach bezpośredniego przylegania TCs do DECs [3].

Wśród innych cząstek, których ekspresja zmienia się podczas cyklu, na uwagę zasługuje α -krystalina B. Gruidl i wsp. [7] porównali DNA endometrium fazy proliferacyjnej i DNA endometrium w 5 dni po owulacji. Klony DNA, które było „aktywne” w 5 dni po owulacji, a „nieaktywne” w fazie proliferacyjnej były identyczne w wielu fragmentach z fragmentami DNA kodującymi krystalinę. Ekspresja mRNA krystaliny była niezauważalna w fazie proliferacyjnej, rosła natomiast w fazie sekrecyjnej. Podobnie było z ekspresją α -krystaliny B na powierzchni komórek endometrialnych. Ekspresja tej molekuly może być regulowana przez podawanie octanu medroksyprogesteronu lub obniżenie stężenia estrogenów.

Inną glikoproteiną syntetyzowaną w czasie cyklu, z maksymalną ekspresją podczas „okna implantacyjnego” jest glikoproteina podobna do mucyny – MUC-1. Lokalizacja za pomocą przeciwciał wykazała jej obecność w aparacie Golgiego około 5 dnia cyklu, natomiast między 17 a 19 dniem na powierzchni endometrium, później jednak nie stwierdzono jej ekspresji [11].

Ciekawymi strukturami kierującymi uwagę na inne niż integryny markery wyznaczające „okno implantacyjne” są pinopodia komórek endometrialnych. Nikas i wsp. [20] zbadali za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego obecność pinopodiów na szczytowej powierzchni komórek endometrialnych od strony światła macicy. Największa wrażliwość endometrium na implantację jest obserwowana w czasie, gdy pinopodia są w pełni wykształcone. Pojawiają się one po sześciu dniach od owulacji (LH+6) i zanikają po około 9 dniach (LH+9). Czas życia pinopodiów nie przekracza 48 godzin, jednak w pełni wykształcone są obecne na endometrium nie dłużej niż przez 1 dobę. Czas występowania w pełni wykształconych pinopodiów u kobiet jest różny. Nie zależy od poziomu estrogenów lub progesteronu w osoczu i może wyznaczać najlepszy okres dla implantacji blastocysty.

Aghajanova i wsp. [1], wykorzystując techniki immunohistochemiczne i mikroskop elektronowy, przeanalizowali współwystępowanie komórkowej ekspresji LIF i LIFR białka, z powstałymi podczas fazy sekrecyjnej cyklu pinopodiami. Wspomniani badacze udowodnili silną korelację obecności pinopodiów i ekspresji LIFR w nabłonku endometrialnym. Wykazali również maksymalną ekspresję LIF i LIFR między 6 a 9 dniem fazy sekrecyjnej w powiązaniu z rozwojem w pełni morfologicznie wykształconych pinopodiów. Ponadto zaobserwowano silniej wyrażoną ekspresję LIFR na powierzchni komórek nabłonkowych w odróżnieniu od komórek gruczołowych endometrium. Uzasadnieniem tego zjawiska może być regulacja na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego między LIF proteiną i LIF receptorem podczas nasilonej ekspresji LIF w gruczołach. Współwystępowanie natężonej ekspresji receptorów LIF z obecnością pinopodiów wskazuje na rolę LIF w procesach apozycji i adhezji blastocysty do błony śluzowej en-

dometrium. Wydaje się, że obserwowany w nabłonku endometrialnym gwałtowny wzrost rozmiarów komórek, które podejmują wysiłek kształtowania pinopodiów towarzyszy intensywnym zmianom ekspresji molekuli sygnalizacyjnych i może stanowić najważniejsze wydarzenie w procesie różnicowania komórkowego. Na tym etapie zmian nabłonek endometrialny jest podatny na przyjęcie blastocysty.

Dotychczasowe badania wykazały, że obecność niektórych cząstek integrynowych może być pewnym molekularnym wyznacznikiem różnicowania komórkowego w okresie okołoinplantacyjnym [14]. Integryna $\alpha4\beta1$ – nieobecna podczas fazy proliferacyjnej – pojawia się na powierzchni komórek gruczołowych endometrium natychmiast po owulacji (14 dzień cyklu), a jej ekspresja zanika wraz z utratą maksymalnej receptywności tkanki endometrialnej (24 dnia cyklu). Integryna $\alpha v\beta3$ natomiast ekspozycja jest na powierzchni komórek gruczołowych endometrium po 19 dniu cyklu, czyli na początku okresu „okna implantacyjnego”. Z kolei integryna $\alpha1\beta1$ pojawia się na powierzchni endometrialnych komórek nabłonkowych między 15 a 28 dniem cyklu. Zatem wspólną ekspresję tych integryn ($\alpha1\beta1$, $\alpha4\beta1$ i $\alpha v\beta3$) zaobserwowano na komórkach endometrialnych podczas czterech dni, od 20 do 24 dnia cyklu, w 28-dniowym cyklu miesięcznym! Jest to okres odpowiadający hipotetycznemu „oknu implantacyjnemu”. Prawdopodobnie taka właśnie konstelacja ekspresji integrynowej umożliwia, bądź ułatwia matczy-no- płodowe interakcje międzykomórkowe oraz zapewnia prawidłowe zakończenie procesu implantacji blastocysty.

Złożony proces implantacji blastocysty, składający się z fazy apozycji, przylegania i inwazji jest determinowany możliwością ścisłego przylegania i wzajemnego oddziaływania komórek zarodkowego trofoblastu z matczynym endometrium. Coraz bardziej udoskonalane protokoły badawcze, w badaniach na zwierzętach, pozwalają na precyzyjne określenie czasu implantacji i wyznaczenie stopnia zaangażowania w tym procesie poszczególnych składników macierzy pozakomórkowej. Doświadczenie przeprowadzone przez Roya i wsp., polegające na immunohistochemicznej i zymograficznej ocenie zawartości MMP2 w popłuczynach macicznych i ekstraktach tkankowych, pobieranych w odpowiednich przedziałach czasowych okresu implantacji po inseminacji u myszy, wykazało istotną zależność pomiędzy wzrostem ekspresji MMP2 w błonie endome-

trialnej podczas wczesnych etapów implantacji od interakcji blastocysty z tkanką endometrialną. Autorzy sugerują ponadto koincydencję zróżnicowanej aktywności poszczególnych MMPs z aktywnością komórek NK podczas tych samych etapów implantacji [22].

Przeprowadzone w ostatnim czasie badania nad ekspresją endometrialnych integryn $\alpha1\beta1$, $\alpha4\beta1$ i $\alpha v\beta3$ u kobiet poddanych zabiegom IVF-ICSI (intracytoplasmic sperm injection), wykazały statystycznie znacząco wyższą ekspresję $\alpha v\beta3$ integryny u pacjentek, które zaszły w ciążę po leczeniu, oraz statystycznie znacząco wyższą ekspresję $\alpha4\beta1$ integryny u pacjentek, u których leczenie się nie powiodło [28]. Zwraca uwagę to, że bez względu na jakość zarodka, czy stosowaną technikę transferu w procedurach zapłodnienia pozaustrojowego, leczenie może być zakończone niepowodzeniem, jeżeli tkanka endometrialna nie jest „gościinna” wobec blastocysty i „gotowa” na implantację. Ekspresja wybiórczych integryn może zatem odgrywać rolę w prognozowaniu wyników leczenia niepłodności procedurami zapłodnienia pozaustrojowego.

Wyjaśnienie właściwości endometrium w czasie „okna implantacyjnego” jest więc jednym z podstawowych zagadnień problematyki leczenia niepłodności.

Podsumowując, badania nad ekspresją zarówno molekularnych jak i morfologicznych wyznaczników endometrialnej receptywności mogą ułatwić określenie czasu największej wrażliwości macicy na implantację blastocysty. Poznane procesy regulacyjne, udowodnione zjawiska oraz potwierdzone obserwacje staną się pomocne w określeniu optymalnego czasu transferu zarodków. Mogą również służyć w stworzeniu diagnostycznych testów skriningowych potencjalnej implantacji. Przy bardzo dynamicznym rozwoju technik zapłodnienia pozaustrojowego należy również rozważyć możliwość stosowania w terapii niektórych molekularnych markerów endometrialnej receptywności (cytokin, czynników wzrostu, integryn, kadheryn), regulujących miejscowo złożony proces implantacji podczas fazy wydzielniczej u niepłodnych kobiet. Określenie swojej dla okresu okołoinplantacyjnego konfiguracji antygenowej endometrium i poznanie czynników za nią odpowiedzialnych może się przyczynić do poprawy wyników leczenia, które niestety nadal są dalekie od oczekiwań niepłodnych pacjentek, jak i lekarzy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Aghajanova L., Stavreus-Evers A., Nikas Y., Hovatta O., Landgren B.M.: Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertil. Steril.*, 2003; 79 (Suppl.1): 808–814
- [2] Aplin J.D., Spanswick C., Behzad F., Kimber S.J., Vicovac L.: Integrins beta 5, beta 3 and alpha v are apically distributed in endometrial epithelium. *Mol. Hum. Reprod.*, 1996; 2: 527–534
- [3] Bulla R., Villa A., Bossi F., Cassetti A., Radillo O., Spessotto P., De Seta F., Guaschino S., Tedesco F.: VE-cadherin is a critical molecule for trophoblast-endothelial cell interaction in decidual spiral arteries. *Exp. Cell Res.*, 2005; 303: 101–113
- [4] Chao K.H., Ho H.N.: Decreased expression of CD-25 on decidual T lymphocytes is mediated by proteolytic activity of MMPs from trophoblasts. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2004; 51: 419–420
- [5] Cross J.C., Werb Z., Fisher S.J.: Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*, 1994; 266: 1508–1518
- [6] Dawood M.Y., Lau M., Khan-Dawood F.S.: E-cadherin and its messenger ribonucleic acid in periimplantation phase human endometrium in normal and clomiphene-treated cycles. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1998; 178: 996–1001
- [7] Gruidl M., Buyuksal A., Babaknia A., Fazleabas A.T., Sivarajah S., Satyaswaroop P.G., Tabibzadeh S.: The progressive rise in the expression of alpha crystallin B chain in human endometrium is initiated during the implantation window: modulation of gene expression by steroid hormones. *Mol. Hum. Reprod.*, 1997; 3: 333–342
- [8] Jakóbisziak M., Gaciong Z., Górecki D.: *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995, 170–180
- [9] Klentzeris L.D.: Adhesion molecules in reproduction. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1997; 104: 401–409
- [10] Klentzeris L.D., Bulmer J.N., Trejdosiewicz L.K., Morrison L., Cooke I.D.: Beta-1 integrin cell adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile women. *Hum. Reprod.*, 1993; 8: 1223–1230

- [11] Kliman H.J., Feinberg R.F., Schwartz L.B., Feinman M.A., Lavi E., Meaddough E.L.: A mucin-like glycoprotein identified by MAG (mouse ascites Golgi) antibodies. Menstrual cycle-dependent localization in human endometrium. *Am. J. Pathol.*, 1995; 146: 166–181
- [12] Kurpisz M.: Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych ssaków. *Termedia Wydawnictwa Medyczne Poznań 2002*, 228–231
- [13] Lanteri E., Pistrutto M., Bartoloni G., Cordaro S., Stivala F., Montoneri C.: Expression of alpha-6 and beta-4 integrin subunits on human endometrium throughout the menstrual cycle and during early pregnancy. *Fertil. Steril.*, 1998; 69: 37–40
- [14] Lessey B.A., Castelbaum A.J., Buck C.A., Lei Y., Yowell C.W., Sun J.: Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil. Steril.*, 1994; 62: 497–506
- [15] Lessey B.A., Castelbaum A.J., Sawin S.W., Sun J.: Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil. Steril.*, 1995; 63: 535–542
- [16] Lessey B.A., Ilesanmi A.O., Lessey M.A., Riben M., Harris J.E., Chwalisz K.: Luminal and glandular endometrial epithelium express integrins differentially throughout the menstrual cycle: implications for implantation, contraception, and infertility. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1996; 35: 195–204
- [17] Lessey B.A., Yeh I., Castelbaum A.J., Fritz M.A., Ilesanmi A.O., Korzeniowski P., Sun J., Chwalisz K.: Endometrial progesterone receptors and markers of uterine receptivity in the window of implantation. *Fertil. Steril.*, 1996; 65: 477–483
- [18] Lopata A.: Blastocyst-endometrial interaction: an appraisal of some old and new ideas. *Mol. Hum. Reprod.*, 1996; 2: 519–525
- [19] Meyer W.R., Castelbaum A.J., Somkuti S., Sagoskin A.W., Doyle M., Harris J.E., Lessey B.A.: Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity. *Hum. Reprod.*, 1997; 12: 1393–1398
- [20] Nikas G., Drakakis P., Loutradis D., Mara-Skoufari C., Koumantakis E., Michalas S., Psychoyos A.: Uterine pinopodes as markers of the 'nidation window' in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. *Hum. Reprod.*, 1995; 10: 1208–1213
- [21] Psychoyos A.: Hormonal control of uterine receptivity for nidation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 1976; 25: 17–28
- [22] Roy T.K., Povea-Pacci H.S., Stanger J.: Active MMP2 is released during the early phases of embryo implantation in QS mice: implications for immune phenomena at implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2004; 51: 421–422
- [23] Ruoslahti E., Pierschbacher M.D.: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 1987; 238: 491–497
- [24] Sakkas D., Lu C., Zulfikaroglu E., Neuber E., Taylor H.S.: A soluble molecule secreted by human blastocysts modulates regulation of HOXA10 expression in an epithelial endometrial cell line. *Fertil. Steril.*, 2003; 80: 1169–1174
- [25] Tabibzadeh S.: Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum. Reprod.*, 1992; 7: 876–882
- [26] Tabibzadeh S., Kong Q.F., Babaknia A., May L.T.: Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Hum. Reprod.*, 1995; 10: 2793–2799
- [27] Thomas K., Thomson A., Wood S., Kingsland C., Vince G., Lewis-Jones I.: Endometrial integrin expression in women undergoing *in vitro* fertilization and the association with subsequent treatment outcome. *Fertil. Steril.*, 2003; 80: 502–507
- [28] Turpeenniemi-Hujanen T., Ronnberg L., Kauppila A., Puistola U.: Laminin in the human embryo implantation: analogy to the invasion by malignant cells. *Fertil. Steril.*, 1992; 58: 105–113