

Роль PAI-1 в повторных неудачах ВРТ

Асп. Т.А. ОХТЫРСКАЯ¹, д.м.н., проф. К.А. ЯВОРОВСКАЯ, д.м.н. А.В. ШУРШАЛИНА, к.м.н. Т.А. ДЕМУРА, к.м.н. Н.М. ФАЙЗУЛЛИНА, к.м.н. Л.С. ЕЖОВА

Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва

Представлены результаты распространенности полиморфизма гена PAI-1 -675 5G/4G и уровня экспрессии белка PAI-1 в эндометрии в период «окна имплантации» у пациенток с двумя и более неудачными попытками ЭКО в анамнезе. Установлено, что пациентки с неудачными попытками ЭКО в анамнезе характеризуются высокой частотой гетеро- и гомозиготного носительства полиморфизма гена PAI-1 (77,7%). При иммуногистохимическом исследовании эндометрия выявлен высокий уровень белка PAI-1 в поверхностном эпителии эндометрия, что, вероятно, является причиной нарушения адгезии и инвазии бластоцисты. Выявлена зависимость уровня белка PAI-1 в эндометрии от полиморфизма гена PAI-1.

Ключевые слова: PAI-1, эндометрий, имплантация, бластоциста, неудачи ЭКО.

С каждым годом во всем мире увеличивается количество бесплодных супружеских пар, нуждающихся в применении вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Однако, несмотря на высокую востребованность метода, кардинальных изменений в его эффективности не происходит [3, 6]. Только 15–20% перенесенных в полость матки эмбрионов в программах ЭКО успешно имплантируется [3]. Около 30% бесплодных супружеских пар, проходящих лечение, сталкиваются с повторными неудачами ЭКО [5]. В случае переноса в полость матки эмбрионов хорошего качества и исключения всех явных причин, препятствующих благополучному завершению программы, неудачу ЭКО расценивают как нарушение на этапе имплантации эмбриона [12, 17].

Считается, что в генезе имплантационных потерь важную роль играет нарушение функционирования эндометрия на молекулярно-клеточном уровне [2, 13, 17].

В качестве одной из причин патологии имплантации и повторных неудачных программ ЭКО, ряд авторов рассматривают наследственные полиморфизмы генов предрасположенности к тромбофилии (мутация Лейдена, мутация протромбина, полиморфизм гена ингибитора активатора плазминогена 1 типа (PAI-1), полиморфизмы генов фолатного обмена), приводящие к гиперкоагуляции и локальному микротромбообразованию [17, 18]. Важным фактором регуляции активности фибринолитической системы крови является ингибитор активатора плазминогена 1 типа (PAI-1) [4].

PAI-1 синтезируется и секретируется в кровь клетками эндотелия сосудов, а также гепатоцитами, моноцитами, фибробластами, гладкомышечными клетками. При гистологических исследованиях PAI-1 обнаруживается практически во всех тканях и представляет собой белок, состоящий из 379 аминокислотных остатков, молекулярным весом 48 kDa, принадлежащий к семейству серпинов. Повышение

PAI-1 в плазме крови является наиболее часто встречающейся причиной снижения фибринолитической активности крови [4].

Наиболее частый полиморфизм PAI-1 –675 5G/4G связан с делецией в промоторном участке гена, определяющем скорость транскрипции. Уровень белка PAI-1 в плазме крови у 4G/4G гомозигот на 30% выше, чем у 5G/5G гомозигот [4, 20]. Гипофибринолиз, обусловленный 4G/4G генотипом, связывают с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний, метаболических нарушений и таких осложнений беременности, как ретрохориальные гематомы, фетоплацентарная недостаточность, внутриутробная задержка развития плода, преэклампсия [1, 4].

Обсуждается связь полиморфизма гена PAI-1 с привычным невынашиванием беременности [8] и повторными имплантационными потерями в программах ЭКО [10, 13].

Наряду с регуляцией фибринолиза, PAI-1 участвует в протеолитическом каскаде, вовлеченном в физиологические и патологические процессы инвазии и ремоделирования тканей [7, 8, 11]. В тканях плазмин является ключевым ферментом внеклеточного протеолиза. Для образования плазмина необходимо связывание урокиназного активатора плазминогена (uPA) с его рецептором (uPAR), что способствует активации участков адгезии на поверхности клеток, внутриклеточному фосфорилированию, инициируется протеолиз межклеточного матрикса и миграция клеток, т.е. процессы, лежащие в основе формирования инвазивного фенотипа клеток. Связывание PAI-1 с uPA подавляет образование плазмина (рис. 1).

Нарушение экспрессии PAI-1 в тканях связывают с воспалительными и опухолевыми процессами,

¹e-mail: okhtyrskaya@mail.ru

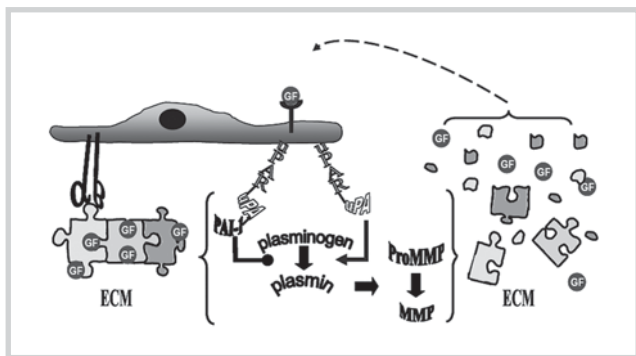


Рис. 1. Механизм протеолиза межклеточного матрикса.

Физиологический контроль протеолиза межклеточного матрикса осуществляется посредством регуляции активации плазминогена на поверхности клеток, что в свою очередь влияет на активность матриксных металлопротеиназ. Локальный протеолиз нарушает архитектуру межклеточного матрикса, связь между клетками, опосредованную интегринными, стимулирует ростовые факторы. PAI-1 подавляет uPA-зависимое образование плазмина. uPAR — рецептор урокиназного активатора плазминогена, ECM — межклеточный матрикс, GF — ростовые факторы, MMP — матриксные металлопротеиназы; $\alpha\beta$ — субъединицы интегринных [11].

заболеваниями соединительной ткани, спаечной болезнью, атеросклерозом, ожирением, эндометриозом [4, 7, 14]. Показана роль PAI-1 в процессе овуляции и эмбриогенеза [11].

В эндометрии мРНК PAI-1 экспрессируется эндотелиальными клетками сосудов стромы на протяжении всего менструального цикла и достигает пика в среднюю и позднюю секреторную фазы под влиянием прогестерона. Белок PAI-1 обнаруживается в клетках стромы на протяжении всего цикла; в позднюю секреторную фазу уровень белка максимален и преимущественно определяется в децидуальных клетках подэпителиального слоя стромы; отмечается совместная экспрессия PAI-1 и uPA в децидуальных клетках стромы [16, 19].

Физиологическое увеличение экспрессии PAI-1 клетками стромы эндометрия в секреторную фазу менструального цикла способствует имплантации бластоцисты, ограничивает межклеточный протеолиз и снижает риск геморрагий в период инвазии трофобласта [18]. При этом чрезмерно высокий уровень PAI-1 связывают со снижением глубины инвазии трофобласта и нарушением имплантации [8].

Цель настоящего исследования — оценить влияние 5G/4G полиморфизма гена PAI-1 на уровень и локализацию белка PAI-1 в эндометрии у пациенток с повторными неудачами программ ЭКО по сравнению с группой здоровых женщин с реализованной репродуктивной функцией.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 108 пациенток в возрасте от 24 до 37 лет (средний возраст пациенток $31,7 \pm 3,2$ года) с трубно-перитонеальным фактором

бесплодия и наличием в анамнезе неудачных программ ЭКО. В исследовании использовали клинические, лабораторные, ультразвуковые, морфологические, иммуногистохимические и генетические методы. При проведении гормонального обследования у всех пациенток был подтвержден нормальный овариальный резерв.

Критериями исключения из исследования явились соматические и гинекологические заболевания, влияющие на репродуктивную функцию и рецептивность эндометрия.

Все пациентки были обследованы на наличие генетического полиморфизма гена PAI-1-675 5G/4G методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real-timePCR) с использованием диагностических наборов компании «ДНК-Технологии» (Россия).

Все пациенткам была проведена аспирационная биопсия эндометрия (инструментом Pipelle) в период «окна имплантации» (овуляция + 7 дней). Материал, полученный при Pipelle-биопсии, после промывания физиологическим раствором и фиксации в 10% нейтральном формалине, заливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилином и эозином. На основании морфологической структуры эндометрия из основной группы ($n=108$) было отобрано 22 образца для иммуногистохимического этапа работы. В 1-ю группу вошли биоптаты 11 пациенток с 4G/4G и 5G/4G PAI-1 полиморфизмом; во 2-ю группу — 11 пациенток с 5G/5G PAI-1 полиморфизмом. В качестве группы контроля для иммуногистохимии был исследован эндометрий 11 здоровых женщин с реализованной репродуктивной функцией без гинекологической патологии, обследованных на полиморфизм гена PAI-1-675 5G/4G.

Иммуногистохимические реакции проводили на депарафинированных срезах толщиной 4–5 мкм с первичными антителами к PAI-1 (H-135, «SantaCruzBiotechnology», США, a rabbit polyclonal antibody, разведение 1:200). Результаты иммуногистохимической реакции оценивали полуколичественным методом в баллах по общепринятой методике: отсутствие иммуноокрашенных клеток (–) — 0 баллов; менее 5% иммуноокрашенных клеток (\pm) — 0,5 балла; менее 20% иммуноокрашенных клеток (+) — 2 балла; от 20 до 40% окрашенных клеток (++) — 4 балла; более 40% окрашенных клеток (+++) — 6 баллов. Статистическая обработка данных выполнена на персональном компьютере с помощью электронных таблиц Microsoft Excel и пакета прикладных программ StatisticaforWindows версия 7.0, StatSoft Inc (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все пациентки, включенные в исследование ($n=108$), имели в анамнезе так называемые «имплан-

тационные потери», т.е. ненаступление беременности в программе ЭКО при нормальном овариальном ответе на стимуляцию и оплодотворении более 60% ооцитов, отсутствии патологии полости матки и переносе в полость матки в предшествующих программах ЭКО более 4 эмбрионов хорошего качества без эффекта [12]. Среднее количество перенесенных эмбрионов в анамнезе составило $6,0 \pm 2,1$.

Частота встречаемости PAI-1-675 5G/4G полиморфизма в общей группе пациенток ($n=108$) составила: 4G/4G:5G/4G:5G/5G=0,31:0,47:0,22, что совпадает с данными литературы о распространенности полиморфизмов гена PAI-1 в популяции — 0,25:0,5:0,25 [4] (рис. 2).

Выбор пациенток для иммуногистохимического исследования эндометрия был основан на носительстве полиморфизма гена PAI-1-675 5G/4G. В табл. 1 представлено распределение полиморфизма PAI-1-675 5G/4G среди пациенток исследуемых групп.

При иммуногистохимической реакции белок PAI-1 был выявлен в эндотелии сосудов, поверхностном эпителии и в строме эндометрия в виде коричневого окрашивания. Независимо от локализации уровень белка PAI-1 был достоверно выше у пациенток с бесплодием и повторными неудачами ЭКО (1-я и 2-я группы) по сравнению с группой здоровых рожавших женщин (группа контроля) ($p < 0,05$). При этом во всех трех группах максимальный уровень белка наблюдался в поверхностном эпителии эндометрия и составил $4 \pm 1,2$ балла в 1-й группе; $3,4 \pm 2,2$ балла во 2-й группе; $0,95 \pm 1,23$ балла в группе контроля ($p < 0,05$). Крайне важно отметить, что уровень белка PAI-1 в поверхностном эпителии у пациенток с бесплодием и неудачными попытками ЭКО был в 3—4 раза выше по сравнению с группой контроля (табл. 2; рис. 3).

При сравнении уровня белка PAI-1 в эндометрии пациенток 1-й и 2-й группы были установлены статистически значимые отличия. В строме и в эндотелии сосудов уровень белка PAI-1 был достоверно вы-

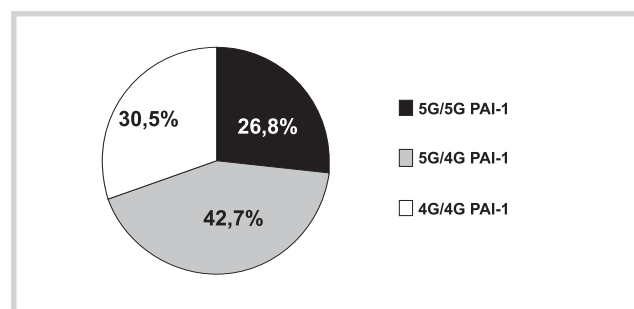


Рис. 2. Встречаемость полиморфизмов гена PAI-1 5G/4G среди пациенток с повторными неудачами ЭКО.

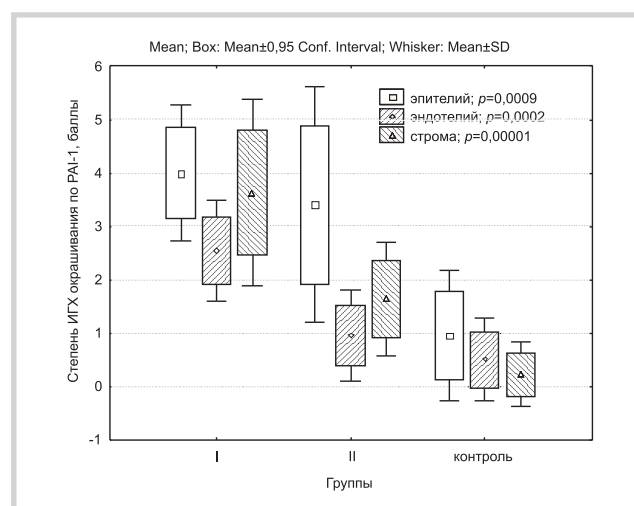


Рис. 3. Уровень PAI-1 в эндометрии пациенток 1-й, 2-й группы и группы контроля ($p < 0,05$).

ше у пациенток 1-й группы с наличием 4G аллеля PAI-1 по сравнению с пациентками 2-й группы с 5G/5G полиморфизмом гена PAI-1-675 5G/4G ($p < 0,05$).

В литературе приводятся данные о влиянии 4G аллеля PAI-1 на уровень белка PAI-1 в плазме крови и тканях [4, 20]. При проведении корреляционного

Таблица 1. Распределение полиморфизма PAI-1-675 5G/4G среди пациенток исследуемых групп

Исследуемые группы	Варианты полиморфизма гена PAI-1		
	4G/4G PAI-1	5G/4G PAI-1	5G/5G PAI-1
1-я ($n=11$)	8	3	—
2-я ($n=11$)	—	—	11
Контроль ($n=11$)	1	4	6

Таблица 2. Определение белка PAI-1 в клетках эндометрия

Группа	Уровень PAI-1 (баллы)		
	поверхностный эпителий	строма	эндотелий
1-я ($n=11$)	$4 \pm 1,2^{**}$	$2,55 \pm 1,7^{**}$	$3,64 \pm 0,93^{**}$
2-я ($n=11$)	$3,41 \pm 2,2$	$1,64 \pm 1$	$0,95 \pm 0,85$
Контроль ($n=11$)	$0,95 \pm 1,23^*$	$0,23 \pm 0,6^*$	$0,5 \pm 0,77^*$

Примечание.* — при сравнении показателей с аналогичными в 1-й и 2-й группе ($p < 0,05$), ** — при сравнении показателей с аналогичными во 2-й группе ($p < 0,05$).

Таблица 3. Корреляция (r) между аллелем 4G PAI-1 и уровнем белка PAI-1 в эндометрии

Группа	PAI-1		
	поверхностный эпителий	строме	эндотелий сосудов
1-я ($n=11$)	0,33 ($p>0,05$)	0,6 ($p<0,05$)	0,37 ($p>0,05$)
Контрольная ($n=11$)	0,85 ($p<0,01$)	0,75 ($p<0,01$)	0,84 ($p<0,01$)

анализа мы выявили прямую зависимость между наличием 4G аллеля PAI-1 и уровнем белка PAI-1 в эндометрии. При этом в группе здоровых рожавших женщин (группа контроля) выявлено значимое влияние 4G аллеля PAI-1 на уровень белка PAI-1 в эндометрии. Коэффициент корреляции Пирсона в эндотелии сосудов группы контроля составил 0,84 ($p<0,05$), в строме — 0,75 ($p<0,05$), в поверхностном эпителии — 0,85 ($p<0,05$). В группе пациенток с повторными неудачами программы ЭКО статистически значимая корреляция была выявлена только в строме эндометрия (табл. 3). По данным литературы, на уровень белка PAI-1 в тканях влияют локальные аутокринные и паракринные факторы: ростовые факторы, цитокины, прогестерон [21]. Более слабое влияние 4G аллеля PAI-1 на уровень экспрессии белка PAI-1 в эндометрии у пациенток с бесплодием может быть обусловлено перенесенными ранее воспалительными процессами, оперативными вмешательствами в полости матки и подтверждает наличие локальных механизмов регуляции синтеза белка в эндометрии.

В литературе [15, 20] представлены ограниченные данные об уровне и локализации белка PAI-1 в эндометрии [9, 19]. По мнению J. Nordengren и соавт., физиологическое увеличение PAI-1 в секреторную фазу менструального цикла является важным фактором, необходимым для имплантации, который ограничивает межклеточный протеолиз и снижает риск геморагий в период инвазии бластоцисты [19]. При этом чрезмерно высокий уровень PAI-1 связывают со снижением глубины инвазии трофобласта и нарушением имплантации [13].

В 1996 г. в работе F. Khamsi и соавт. было показано, что эмбрионы на стадии бластоцисты секретируют активаторы плазминогена, принимая тем самым активное участие в протеолизе межклеточного матрикса на начальных этапах инвазии. Возможно, обнаруженный в нашей работе высокий уровень PAI-1 в поверхностном эпителии у пациенток с повторными неэффективными попытками ЭКО, является причиной подавления активаторов плазминогена, секретируемых бластоцистой на этапе адгезии. Таким образом, высокий уровень PAI-1 в эндометрии пациенток с неэффективными попытками ЭКО, вероятнее всего, является не просто фактором риска микротромбообразования и локального гипофибринолиза, но и возможной причиной нарушения взаимодействия бластоцисты и эндометрия на этапе адгезии и начальных стадиях инвазии.

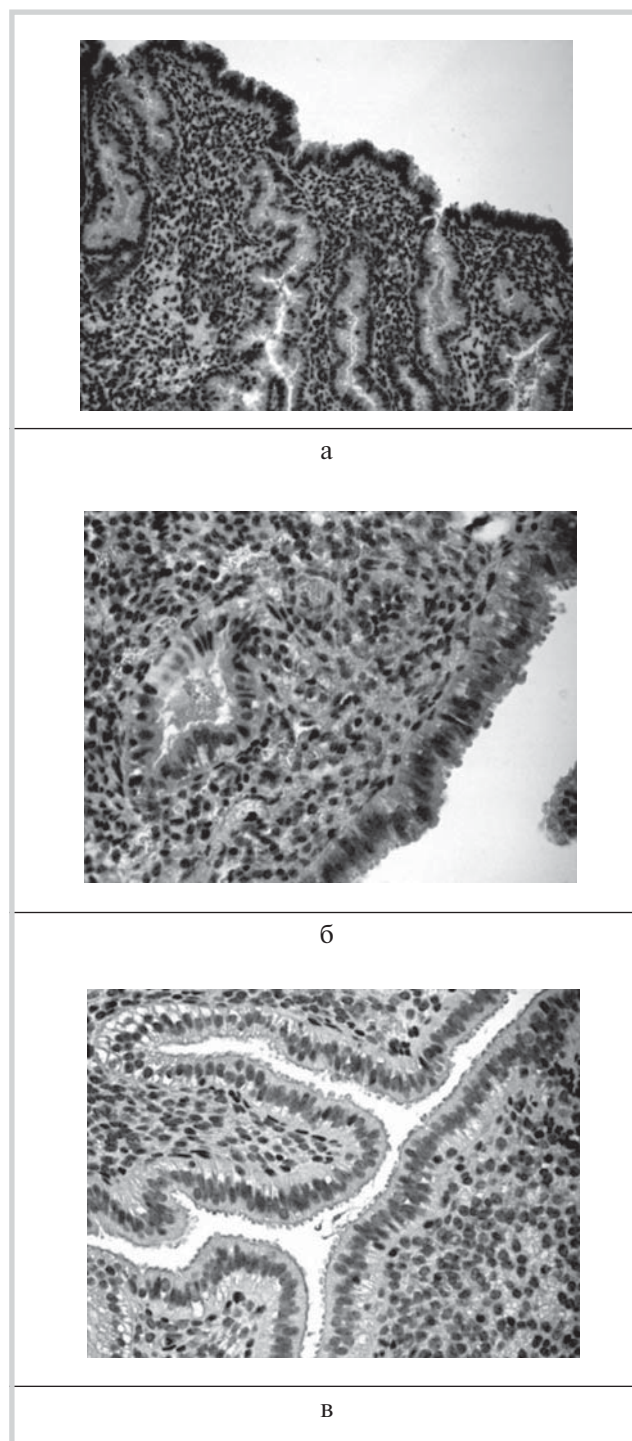


Рис. 4. Экспрессия PAI-1 в эндометрии в период «окна имплантации» (ИГХ).

а — 1-я группа, $\times 100$; б — 2-я группа, $\times 400$; в — группа контроля, $\times 400$.

Таким образом, из полученных результатов следует, что повторные неудачные попытки ЭКО должны быть поводом для разнонаправленного поиска, включающего в себя детальное исследование эндо-

метрия и обследование на наследственные полиморфизмы генов предрасположенности к тромбофилии, в том числе полиморфизм гена PAI-1-675 5G/4G.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Александрова Н.В., Дубова Е.А., Донников А.Е. и др.* Полиморфизм генов тромбофилии и морфологические изменения плаценты при беременности, наступившей с помощью вспомогательных репродуктивных технологий. Международный конгресс по репродуктивной медицине, 5-й: Тезисы. Пробл репрод 2011;43—44 (спец. выпуск).
2. *Дюжева Е.В.* Гормональная подготовка эндометрия у пациенток с неэффективными попытками ЭКО в анамнезе: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М 2010.
3. *Корсаков В.С.* ВРТ в России. Отчет за 2008 г. Пробл репрод 2010;6:15—16.
4. *Панченко Е.А., Добровольский А.Б.* Тромбозы в кардиологии. Механизмы развития и возможности терапии 1999;164—173.
5. *Судомы И.А., Маслий Ю.В.* Алгоритм обследования и лечения пациентов с многократными неудачными программами ВРТ. Репродуктивные технологии сегодня и завтра. Казань 2007;20—21.
6. *Andersen A.N., Gianaroli L., Felberbaum R. et al.* Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE. Hum Reprod 2005;20:1158—1176.
7. *Bedaiwy M.A. et al.* Genetic Polymorphism in the Fibrinolytic System and Endometriosis. Obstet Gynecol 2006;108:Issue 1:162—168.
8. *Buchholz T., Lohse P., Rogenhofer N. et al.* Polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages. Hum Reprod 2003;18:11:2473—2477.
9. *Bruse C., Guan Y., Carlberg M., Carlström K.* Basal release of urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1, and soluble plasminogen activator receptor from separated and cultured endometrial and endometrial stromal and epithelial cells. Fertil Steril 2005;83:1:1155—1160.
10. *Coulam C.B., Jeyendran R.S., Fishel L.A. et al.* Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. Reprod BiomedOnline 2006;12—13:322—332.
11. *Cynthia E. Wilkins-Port, Freytag J., Higgins S.P. et al.* PAI-1: a multifunctional SERPIN with complex roles in cell signaling and migration cell communication insights 2010;3:1—10.
12. *Fiedler K., Wurfel W.* Effectivity of heparin in assisted reproduction. Eur J Med Res 2004;9:207—214.
13. *Goodman C., Jeyendran R.S., Coulam C.B.* P53 tumor suppressor factor, plasminogen activator inhibitor, and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent implantation failure. Fertil Steril 2009;92:494—498.
14. *Guan Y-M., Carlberg M., Bruse C., Carlström K.* Effects of hormones on uPA, PAI-1 and suPAR from cultured endometrial and ovarian endometriotic stromal cells. Acta Obstet Gynecol Scand 2002;81:5:389—397.
15. *Khamsi F., Armstrong D.T., Zhang X.* Expression of urokinase-type plasminogen activator in human preimplantation embryos. Mol Hum Reprod 1996;2—4:273—276.
16. *Koh S.C.L., Wong P.C., Yuen R. et al.* Concentration of plasminogen activators and inhibitor in the human endometrium at different phases of the menstrual cycle. J Reprod Fert 1992;96:407—413.
17. *Margalioth E., Ben-Chetrit A., Gal M., Eldar-Geva T.* Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. Hum Reprod 2006;21:12:3036—3043.
18. *Nelson S.M., Greer I.A.* The potential role of heparin in assisted conception. Hum Reprod Update 2008;14:6:623—645.
19. *Nordengren J., Pilka R., Noskova V. et al.* Differential localization and expression of urokinase plasminogen activator (uPA), its receptor (uPAR), and its inhibitor (PAI-1) mRNA and protein in endometrial tissue during the menstrual cycle. Mol Hum Reprod 2004;10:9:655—663.
20. *Ramón L.A., Gilabert-Estellés J., Cosín R. et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G polymorphism and endometriosis. Influence of PAI-1 polymorphism on PAI-1 antigen and mRNA expression. Thromb Res 2008;122:6:854—860.
21. *Sandberg T., Eriksson P., Gustavsson B. et al.* Differential regulation of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene expression by growth factors and progesterone in human endometrial stromal cells. Mol Hum Reprod 1997;3:9:781—787.