

УДК 57.085.23

©Коллектив авторов

СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЦИТОКИНА LIF НА БЛАСТОЦИСТЫ МЫШИ В ПЕРИОД ИМПЛАНТАЦИИ

Л.М. Межевикина, И.В. Капралова, Е.Е. Фесенко

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, Московской обл.,
ул. Институтская, д. 3; тел.: 925-59-84; факс: (827) 33-05-09;
эл. почта: mezhevikina@rambler.ru

Исследовано действие рекомбинантного цитокина LIF на изолированные зародыши мыши на стадиях средней и поздней бластоцисты. Показано, что этот препарат необходим на этапе формирования полноценного трофобласта после выхода бластоцист из *z. pellucida* в условиях культивирования *in vitro*. В концентрации 10 нг/мл рекомбинантный LIF вызывает усиление адгезии и пролиферативной активности клеток трофобласта, что важно для межклеточных взаимодействий с эндометрием и инвазии зародышей в матку. На клетки внутренней клеточной массы рекомбинантный LIF не оказывает заметного влияния.

Ключевые слова: зародыши мыши, бластоцисты, цитокин LIF, имплантация.

ВВЕДЕНИЕ. Ключевая роль цитокина LIF (Leukemia Inhibitory Factor) в процессах имплантации подтверждена на разных видах животных [1-3] и в практической медицине при лечении некоторых форм бесплодия человека [4-6]. Этот цитокин обнаруживается в клетках репродуктивного тракта на ранних сроках беременности и в зародышах млекопитающих на стадии бластоцисты [4, 7-9].

Начало LIF-экспрессии всегда совпадает с началом формирования стадии бластоцисты и предшествует имплантации зародышей в матку. Максимального уровня концентрация LIF достигает, когда матка становится готовой (рецептивной) для имплантации [1-3, 5, 7, 10]. В этот период существенное значение имеют выход зародышей из *zona pellucida*, взаимодействие трофобластных клеток с люминальным эпителием эндометрия, а также защита “полуаллогенного” зародыша от иммунных ответов матери [11].

Для поддержания функции трофобластной клетки эндометрия синтезирует большое число ростовых факторов и цитокинов, а также специальные белки ZO-1 и E-кадгерин, которые необходимы для регуляции межклеточных взаимодействий в месте прикрепления зародыша [12]. Их функция заключается в обеспечении плотных контактов и создании проницаемого барьера для доступа иммунологически компетентных материнских клеток и/или сигнальных молекул к зародышу и внезародышевым органам.

У мышей и человека прикрепление зародыша и его последующая инвазия в эндометрий запускают каскад реакций в организме матери, которые одновременно активируют матку и эмбрион. Цитокин LIF является основным регулятором децидуальной реакции матки [5, 13-15]. Он пара- и/или аутокринным способом действует на эндометрий и подготавливает его к имплантации [9, 11, 16]. Есть сообщения о том, что эксплантаты ткани эндометрия женщин с нарушенной репродуктивной функцией обнаруживают низкий уровень экспрессии гена *lif*, кодирующего

данный цитокин [17, 18]. Снижение концентрации LIF в период имплантации служит причиной остановки эмбрионального развития [3, 5, 6]. В раннем эмбриогенезе млекопитающих LIF действует как эмбриотрофический фактор [19].

Несмотря на огромный фактический материал, функции цитокина LIF в трофобласт-эндометриальной области мало исследованы. Прежде всего, это связано со сложностью культивирования клеток интактного эпителия матки, которые способны отвечать на разные сигналы гормонов, ростовых факторов и цитокинов, а также способны самостоятельно продуцировать эти регуляторные молекулы *in vitro*. В частности, стромальные клетки мыши после эксплантации в культуру могут спонтанно децидуализироваться и вырабатывать в большом количестве цитокин LIF [8]. Показано также, что при добавлении рекомбинантного LIF в культуру плацентарного цитотрофобласта человека активируется синтез хорионического гонадотропина [15, 20], который производят клетки трофобласта, что свидетельствует о начале беременности.

С учетом этих замечаний исследования цитокина LIF на клеточных культурах эндометрия становятся крайне проблематичными. Непонятно также, могут ли такие культуры точно или с большим приближением дублировать процессы имплантации *in vitro* без изменения активности гормонов и ростовых факторов, действующих в пределах репродуктивного тракта. В данной работе предложена экспериментальная модель развития предимплантационных зародышей мыши в условиях пролонгированного культивирования для оценки характера действия цитокина LIF в период выхода бластоцист из *z. pellucida* и формирования способных к имплантации колоний эмбриональных клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) и трофобласта (ТБ).

МЕТОДИКА. Предимплантационные зародыши мыши на стадии средней и поздней бластоцисты (рис. 1) выделяли из рогов матки на 3,5-4,0 сутки беременности. Для этого самок подсаживали к самцам из расчета 3:1 и утром следующего дня отбирали животных с копулятивными пробками. День обнаружения пробки считали первым днем беременности. В экспериментах использовали мышей линии NMRI (питомник ИБК РАН) в возрасте 6-8 недель. Выделение и культивирование бластоцист проводили в модифицированной среде Виттена (МСВ) с бикарбонатным и органическим буфером HEPES для стабилизации pH 7.2-7.4 [21] и 10 % инактивированной фетальной сыворотки телят ("Sigma", США).

После выделения изолированные бластоцисты оценивали по морфологии под инвертированным микроскопом (Olympus, 70 X в модификации объектива по Хоффману) и культивировали в 100 мкл МСВ в 4-х луночных эмбриологических чашках Петри при 37°C и давлении 5 % CO₂ в газовом инкубаторе ("Sanyo", Япония). Бластоцисты в опытной группе развивались при тех же условиях, но в среду для их культивирования (МСВ) дополнительно вносили 10 нг/мл рекомбинантного цитокина LIF человека ("PeproTech. Inc.", США).

В каждую лунку помещали по 7-10 бластоцист и отслеживали динамику развития через 48 ч культивирования по способности выхода из *z. pellucida* и адгезии к субстрату. В адгезивных бластоцистах рассчитывали общее количество клеток, а также соотношение клеток ВКМ и ТБ в течение семи суток культивирования. Подсчет клеток ВКМ и ТБ проводили с использованием компьютерной программы обработки изображения для цитофотометрии (PhotoM). Статистическую обработку результатов проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Культивирование предимплантационных зародышей мыши (рис. 1, а) показало, что эффективность выхода из *z. pellucida* и доля адгезивных бластоцист (рис.1, б) значительно выше в среде с рекомбинантным цитокином LIF (табл.). Однако следует отметить, что когда бластоцисты находились в *z. pellucida* и не контактировали с поверхностью эмбриологической чашки (48 ч культивирования *in vitro*), LIF не оказывал заметного влияния на темпы развития. В течение этого времени в бластоцистах опытной и контрольной групп обнаруживалось одинаковое число эмбриональных

клеток порядка 138-139 (таблица). Из них более 70% составляли клетки ТБ, которые в дальнейшем взаимодействуют с эндометрием и формируют внезародышевые органы и плаценту.

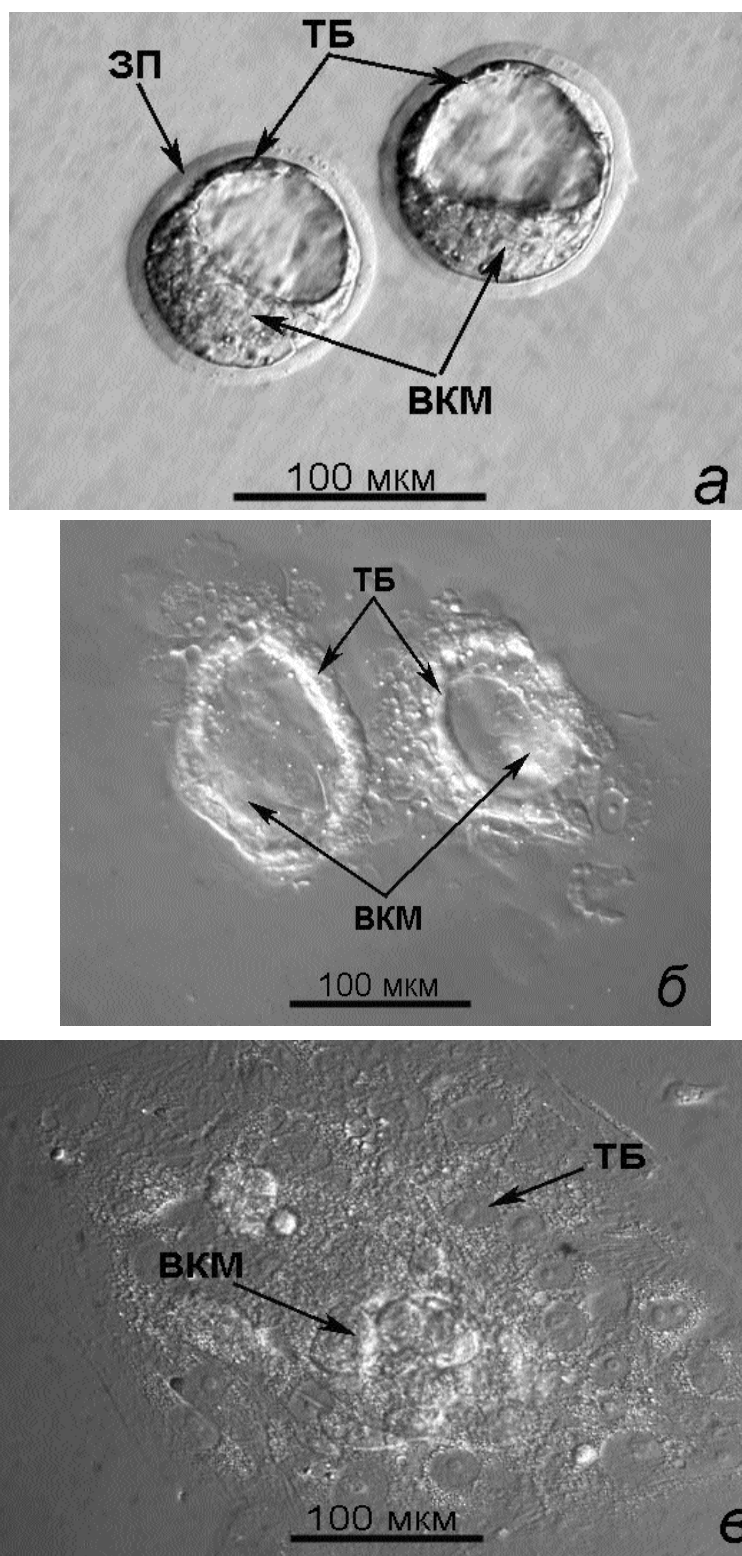


Рисунок 1.

Морфология зародышей мыши на стадии бластоцисты: а) intactные бластоцисты сразу после выделения, б) через двое и в) семь суток культивирования *in vitro*. ВКМ - клетки внутренней клеточной массы, ТБ - клетки трофобласта, ЗП - зона пеллюциды (*z. pellucida*).

ДЕЙСТВИЕ ЦИТОКИНА LIF НА БЛАСТОЦИСТЫ МЫШИ

Таблица. Эффективность культивирования предимплантационных бластоцист мыши линии NMRI в среде с рекомбинантным цитокином LIF.

Среда МСВ	Общее количество бластоцист	Из них адгезивные бластоцисты через 48 ч <i>in vitro</i> , %	Число клеток в одной бластоцисте в динамике развития		
			2 суток	5 суток	7 суток
Цитокин LIF (10 нг/мл)	111	35,3	139,6±6,3	302,4±32,5*	412,2±56,4**
Без цитокина LIF (контроль)	241	17,1	138,2±5,8	237,1±13,0*	294,7±18,4**

Примечание: МСВ - модифицированная среда Виттена с добавлением 10% фетальной сыворотки телят. Различия между двумя группами сравнения достоверны: * - $p=0,03$; ** - $p=0,01$.

Эту способность зародыши мыши приобретают только на стадии бластоцисты после выхода из *z. pellucida*. В культуре *in vitro* они начинают выходить из *z. pellucida* и напрямую контактировать с поверхностью субстрата через 48 ч культивирования. Для этого бластоцисты должны иметь функционально активный слой ТБ. Согласно нашим данным (табл.), цитокин LIF является полноправным участником событий, связанных с активацией и усилением адгезии клеток ТБ (35,3% адгезивных бластоцист против 17,1% в контроле).

При увеличении длительности культивирования адгезивных бластоцист до 5-7-ми суток цитокин LIF в концентрации 10 нг/мл вызывает достоверное увеличение, по сравнению с контролем, общего числа клеток из расчета на одну бластоцисту (таблица). Очевидно, что усиление митотической активности LIF связано с активацией рецепторного комплекса (LIF-рецептора и трансмембранного переносчика *gp130*), через который запускается в эмбриональных клетках JAK/STAT3 путь цитоплазматической сигнализации и экспрессия генов, ответственных за пролиферацию [13, 14, 22].

На более ранних стадиях развития мыши и человека активация JAK/STAT3 сигнального пути приводит к повышению синхронности делений дробления и выживаемости зародышей за счет снижения гибели клеток в результате аномалий и остановки развития [23-25]. В этот период LIF активирует процессы кавитации и тем самым способствует формированию стадии бластоцисты и выходу бластоцист из *z. pellucida* [25]. Предварительная обработка бластоцист рекомбинантным цитокином LIF перед имплантацией приводит к установлению более тесных взаимодействий между эмбриональным трофобластом и эндометрием, что значительно улучшает выживаемость пересаженных зародышей *in vivo* [23].

В литературе активно обсуждаются две основные функции цитокина LIF: 1) подготовка эндометрия для имплантации [2, 3, 5, 6, 24] и 2) подавление пролиферативной активности клеток эмбриональной эктодермы [5, 10, 23]. На стадии бластоцисты у зародышей млекопитающих предшественниками эмбриональной эктодермы являются клетки ВКМ. Мы исследовали влияние рекомбинантного LIF на ВКМ и показали, что в концентрации 10 нг/мл этот препарат поддерживает численность клеток ВКМ на относительно постоянном уровне в течение всего периода культивирования (рис.2). Более высокую активность рекомбинантный LIF обнаруживает по отношению к клеткам ТБ после выхода бластоцист из *z. pellucida* (рис. 3). В адгезивных бластоцистах в присутствии LIF наблюдается прогрессивный рост ТБ по мере увеличения длительности культивирования. По морфологии бластоцист можно судить об избирательности действия рекомбинантного цитокина LIF на клетки ТБ (рис. 1 в).

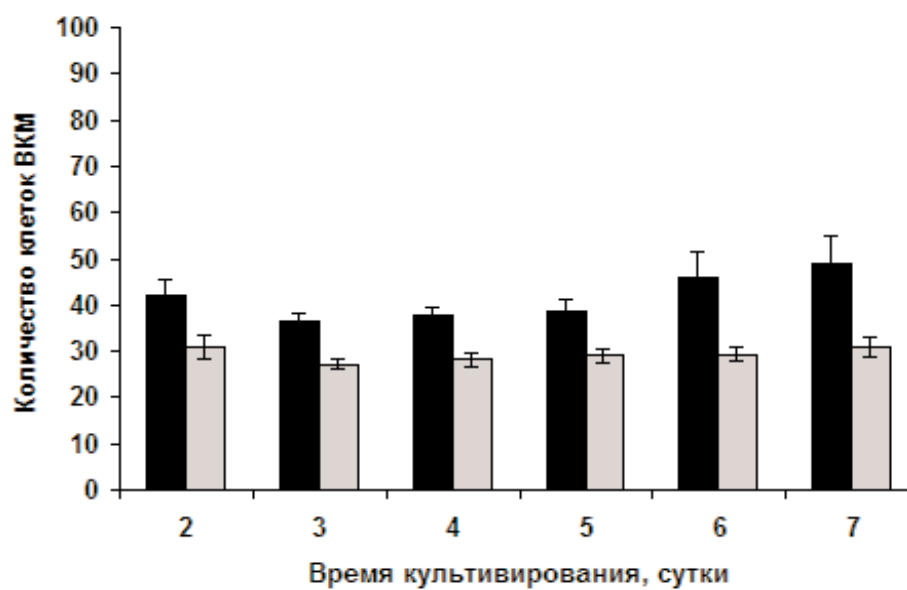


Рисунок 2.

Число клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) в бластоцисте при увеличении длительности культивирования: (■) - с рекомбинантным цитокином LIF, (□) - без использования LIF.

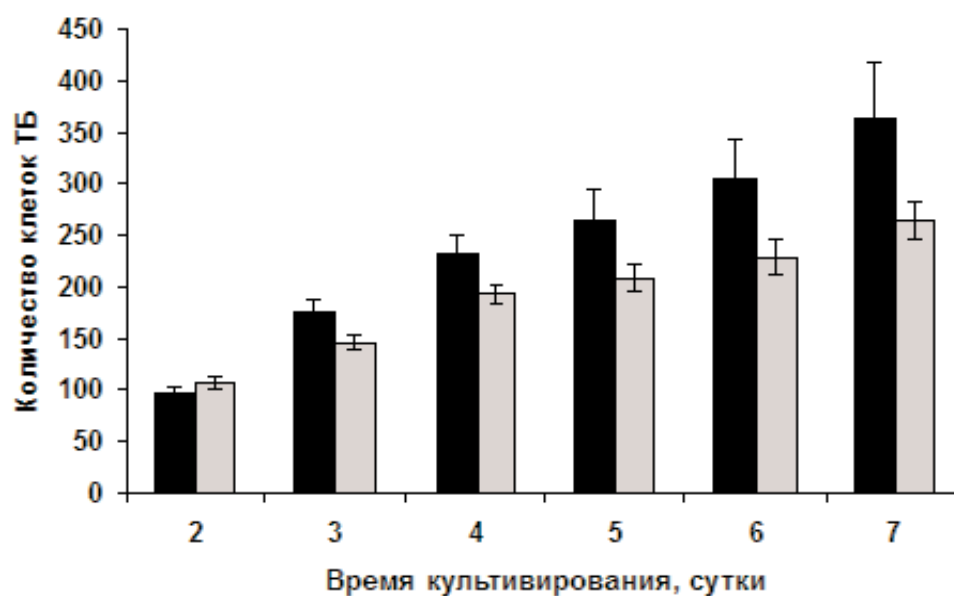


Рисунок 3.

Динамика увеличения числа клеток трофобласта (ТБ) из расчета на одну бластоцисту в зависимости от длительности культивирования: (■) - с рекомбинантным LIF, (□) - без LIF.

ДЕЙСТВИЕ ЦИТОКИНА LIF НА БЛАСТОЦИСТЫ МЫШИ

Таким образом, общее увеличение числа клеток в бластоцисте при использовании пролонгированных условий культивирования и рекомбинантного цитокина LIF происходит в основном за счет увеличения пролиферативной активности ТБ в период имплантации. Наши данные позволяют объяснить факт, что после обработки бластоцист цитокином LIF повышается эффективность трансплантации приемным матерям [2, 3, 5, 24]. Этот цитокин LIF может рассматриваться как перспективный препарат для решения проблем репродукции человека [4, 24]. Он модулирует эффекты геномного импринтинга и улучшает развитие производных трофобласта, в частности, плаценты [24]. Судя по нашим данным, повышенная активность эндометриального LIF в период имплантации [1-3, 5, 9] необходима, прежде всего, для усиления адгезии и пролиферативной активности клеток ТБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Показано, что рекомбинантный цитокин LIF играет важную роль на этапе формирования полноценного трофобласта после выхода бластоцист из *z. pellucida*. В присутствии LIF повышаются адгезивные свойства и пролиферативная активность клеток трофобласта для усиления межклеточных взаимодействий с эндометрием и инвазии зародышей в матку. На число и активность клеток ВКМ рекомбинантный цитокин LIF не оказывает заметного влияния.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант № 05-04-49521) и гранта НШ-2092.2006.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bhatt H., Brunet L.J., Stewart C.L. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 11408-11412.
2. Stewart C.L., Kasoar P., Brunet L.J., Bhatt H., Gadi I., Kontgen F., Abbondanzo S.J. (1992) Nature, **359**, 76-79.
3. Stewart C.L., Cullinan E.B. (1997) Dev. Genet., **21**(1), 91-101.
4. Keltz M.D., Attar E., Buradagunta S., Olive D.L., Kliman H.J., Arici A. (1996) Am. J. Obstet. Gynecol., **175**, 1611-1619.
5. Vogiagis D., Salamonsen L.A. (1999) J. Endocrinology, **160**, 181-190.
6. Kimber S.J. (2005) Reproduction, **130**, 131-145.
7. Kojima K., Kanzaki H., Iwai M., Hatayama H., Fujimoto M., Inoue T., Horie K., Nakayama H., Fujita J., Mori T. (1994) Biol. Reprod., **50**, 882-887.
8. Arici A., Engin O., Attar E., Olive D.L. (1995) J. Clin. Endocrinol., **80**, 1908-1915.
9. Cullinan E.B., Abbondanzo S.J., Anderson P.S., Pollard J.W., Lessey B.A., Stewart C.L. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 3115-3120.
10. Shen M.M., Leder P. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 8240-8244.
11. Paria B.C., Ma W., Tan J., Raja S., Das S.K., Dey S.K., Hogan B.L. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 1047-1052.
12. Paria B.C., Zhao X., Das S.K., Dey S.K., Yoshinaga K. (1999) Devel. Biol., **208**(2), 488-501.
13. Cheng J.G., Chen J.R., Hernandez L., Alvord W.C., Stewart C.L. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 8680-8685.
14. Cheng J.G. (2002) Rev. Endocrin. Metabol. Disord., **3**, 119-126.
15. Sawai K., Matsuzaki N., Okada T., Shimoya K., Koyama M., Azuma C., Saji F., Murata Y. (1997) Biol. Reprod., **56**, 1274-1280.
16. Aplin J.D., Kimber S.J. (2004) Reprod. Biol. Endocrinol., **2**, 1-12.
17. Delage G., Moreau J.F., Letur-Konirsh H., Frydman R., Chaouat G. (1995) Human Reproduction, **10**, 2483-2488.
18. Hambartsoumian E. (1998) American J. Reprod. Immunology, **39**, 137-143.
19. Lavranos T.C., Rathjen P.D., Seamark R.F. (1995) J. Reprod. Fertil., **105**(2), 331-338.

20. *Nachtigall M.J., Kliman H.J., Feinberg R.F., Olive D.L., Engin O., Arici A.* (1996) *J. Clin. Endocrinol Metab.*, **81**, 801-806.
21. *Березовская О.П., Межевикина Л.М., Вепринцев Б.Н.* (1986) *Онтогенез*, **17**(5), 553-555.
22. *Dimetriadis E., White C.A., Jones R.L., Salamonsen L.A.* (2005) *Human Reprod. Update*, **11**(6), 613-630.
23. *Fry R.C.* (1992) *Reprod. Fertil. Dev.*, **4**(4), 449-458.
24. *Mitchell M.H., Swanson R.J., Oehninger S.* (2002) *Biol. Reprod.*, **67**(2), 460-464.
25. *Межевикина Л.М., Федорова В.В., Капралова И.В., Фесенко Е.Е.* (2006) *Онтогенез*, **37**(1), 55-62.

Поступила: 31. 08. 2006.

STIMULATING EFFECT OF RECOMBINANT CYTOKINE LIF ON THE MOUSE BLASTOCYSTS DURING IMPLANTATION

L.M. Mezhevikina, I.V. Kapralova, E.E. Fesenko

Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul., 3, Pushchino,
Moscow Region, 142290, Russia, tel.: 925-59-84; fax: (827) 33-05-09;
e-mail: mezhevikina@rambler.ru

We studied the effect of recombinant cytokine LIF (Leukemia inhibitory factor) on the isolated mouse embryos at the stages of middle and late blastocyst. We showed that this agent is necessary at the formation stage of normal trophoblast after the leaving of blastocysts from *z. pellucida in vitro*. This cytokine (10 ng/ml) results in the intensification of adhesion and proliferative activity of trophoblast cells. It is important for intercellular interactions with endometrium and for invasion of embryos into the uterus. The recombinant LIF has not remarkable influence upon cells of intracellular mass.

Key words: mouse embryos, blastocysts, cytokine LIF, implantation.