

## **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ ЭМБРИОНОМ И МАТЕРЬЮ НА РАННИХ СРОКАХ БЕРЕМЕННОСТИ: ОСНОВА РАЗВИТИЯ ТОЛЕРАНТНОСТИ**

---

Эйтан Р. Барнеа

### **ГИПОТЕЗА**

Живорождение является отличительной чертой беременности млекопитающих и характеризуется тем, что потомство остается в организме матери на протяжении всего периода развития плода. После распознавания и принятия эмбрион получает питание и защиту. Таким образом, иммунологическое принятие и толерантность имеют первостепенное значение для успешного взаимодействия между эмбрионом и матерью на самых ранних сроках беременности. Первичное иммунологическое распознавание происходит до момента имплантации. Полупроницаемая блестящая оболочка (*zona pellucida*) быстро формируется после оплодотворения и защищает эмбрион, пока он не достигнет места внедрения в эндометрий. Эта оболочка окружена материнскими иммунными клетками, что позволяет передавать информацию о произошедшем оплодотворении. Главный вопрос заключается в том, когда и как возникает связь между матерью и эмбрионом, формируется распознавание организмом матери наступающей беременности. Это главная тема данной главы. Кроме этого мы остановим внимание на предимплантационном факторе (ПИФ) — пептиде, который секретируется жизнеспособным эмбрионом, играет важную роль в развитии беременности, способствует росту эмбриона, подготовке матки к имплантации, инвазии трофобласта и участвует в регуляции иммунной системы матери. Это распознавание начинается до прямого контакта эмбриона с организмом матери в матке. Наконец, данные, полученные при использовании экспериментальных моделей аутоиммунных расстройств вне беременности и при трансплантации органов, также дают важную информацию о возможной роли ПИФ при беременности.

### **РАННИЕ НАБЛЮДЕНИЯ: РАСПОЗНАВАНИЕ ЭМБРИОНА ОРГАНИЗМОМ МАТЕРИ НАЧИНАЕТСЯ ДО МОМЕНТА ИМПЛАНТАЦИИ**

В 1973 г. Бир и Биллингем (*Beer, Billingham*)<sup>1</sup> во время изучения механизмов иммунологического распознавания во время беременности у млекопитающих предположили, что организм матери определяет эмбрион на ранних стадиях

и активно реагирует на него. Это вызвало удивление, учитывая генетические различия матери и плода (генетический набор может отличаться на 50 или 100%), а также противоречило распространенному на тот момент мнению, что трофобласт содержит незначительное количество антигенов, и это, по появившемуся предположению, защищает его от клеточного иммунитета матери. Те же авторы предположили, что в организм матери попадают антигены HLA, ответная реакция на которые играет важную роль в наступлении и сохранении беременности. Десять лет спустя они предположили<sup>2</sup>, что локальная иммуносупрессивная и иммунопротективная активность плаценты, основанная на клеточных механизмах, реализуется с помощью супрессорных и других неизвестных клеток. Была высказана гипотеза, что **совместимость по антигенам HLA между родителями приводит к отсутствию распознавания эмбриона организмом матери и его отторжению, т.е. к невынашиванию.**

Хансел и Хики (*Hansel, Hickey*)<sup>3</sup> исследовали у домашних животных различные биологически активные соединения, которые могут принимать участие в распознавании беременности организмом матери. Они выявили несколько протеинов, включая эмбриональный фактор активации тромбоцитов — трофобластический белок с антилютеолитическим действием. Дальнейший прогресс в изучении распознавания эмбриона организмом матери был достигнут Вейтлауфом (*Weitlauf*)<sup>4</sup>, который опубликовал данные о том, что питательная среда, обогащенная эмбриональными клетками, оказывает специфическое влияние на матку крысы в сравнении с контрольными средами и приводит к развитию децидуальной трансформации эндометрия (у небеременных особей). На основе этих результатов возникло предположение о наличии выраженной связи между эмбрионом и матерью до наступления имплантации, однако специфические факторы, влияющие на этот процесс, выявлены не были.

В более поздних исследованиях установили различия нескольких типов плацент у млекопитающих. Гемохориальная плацента (характерна для человека и мышей) отличается тесным взаимодействием с организмом матери, в то время как у других видов отмечается меньшая инвазивность взаимодействия (например, плацента свиньи контактирует с эндометрием через гистиотроф). Кроме того, вещества, секретируемые плацентами различных типов, также отличаются — это ХГЧ у людей, пролактин у грызунов<sup>5</sup> и т.д.

Несмотря на столь большое разнообразие видов имплантации, существуют общие для всех млекопитающих процессы в период до имплантации плодного яйца: слияние яйцеклетки и сперматозоида, развитие оплодотворенной яйцеклетки до стадии бластоцисты. В своем обзоре Моффет (*Moffet*) и Локе (*Loke*)<sup>6</sup> пришли к выводу, что беременность не является классическим феноменом принятия/отторжения. Для лучшего понимания уникального взаимодействия во время беременности необходимо определить конкретные вещества формирующегося зародыша и рецепторы к ним, расположенные на иммунных клетках матери.

## СОХРАНЕНИЕ ЖЕЛТОГО ТЕЛА

Формирующееся после овуляции желтое тело секретирует прогестерон — гормон, оказывающий трофическое действие на эндометрий. Воздействие различных факторов приводит к персистенции желтого тела. Это ХГЧ у человека, пролактин у грызунов и эстрогены у свиней. Все это говорит о том, что у различных видов животных имеются свои **специфические механизмы**

заболевания (в том числе артериальная гипертензия, сахарный диабет, шизофрения) определяются моделью с пороговым эффектом множества факторов риска. Воздействия одного фактора риска зачастую недостаточно для развития заболевания, однако взаимодействие внутренних и внешних факторов может служить отправной точкой для возникновения болезни. Исследования последних лет выявили серию новых составляющих, влияющих на развитие ПНБ. Сейчас обнаружено так много факторов риска, что достаточно часто у определенного пациента можно выявить несколько из них. Факторы риска развития тромбофилии у пациенток с ПНБ встречаются значимо чаще, чем можно было ожидать. При воздействии других факторов у той же пациентки они способны серьезно ухудшить прогноз<sup>75, 76</sup>. Традиционно причины возникновения ПНБ можно разделить на отдельные группы («слоеный пирог»): 10% составляют пороки развития матки, 10% — эндокринные нарушения, 15% — АФС и т.д. В итоге, после учета факторов неустановленной этиологии, должно получиться 100%. Эта модель может и не соответствовать вышеперечисленным параметрам. Именно поэтому я призываю ученых и врачей, работающих в области изучения ПНБ, не ограничиваться этой моделью «пирога»<sup>77</sup>, а придерживаться модели порогового эффекта. Клиническая значимость этого принципа состоит в том, что пациентка с ПНБ должна быть обследована на **выявление всех возможных факторов риска**, и эти исследования не должны прекращаться после обнаружения первого фактора из-за экономических или каких-либо других соображений. Признание, что ПНБ имеет высокую степень наследственной предрасположенности, открывает путь к поиску гена, ответственного за этот процесс, путем анализа сцепления генов в семьях, в которые входят несколько sibлингов с невынашиванием беременности в анамнезе<sup>34</sup> или ПНБ, а также с помощью полногеномного генетического скрининга пациенток с ПНБ и контрольных лиц<sup>78</sup>.

### СВЯЗЬ С АКУШЕРСКИМИ И ПЕРИНАТАЛЬНЫМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ

Женщины с ПНБ в анамнезе относятся к группе высокого риска по возникновению осложнений беременности на поздних сроках. Следовательно, все они должны находиться на особом контроле (например, УЗИ в динамике) в целях снижения уровня заболеваемости и перинатальной смертности. Группа факторов, сочетающихся с развитием ПНБ, включает наличие АФА, тромбофилических факторов, дефицита маннозосвязывающего лектина. Эти факторы, кроме всего прочего, связаны с более низкой массой плода при рождении<sup>57, 66</sup>, что подтверждает гипотезу о том, что во многих случаях ПНБ в качестве первопричины выступает материнский фактор, приводящий к замедлению роста и пролиферации трофобласта. Установленная связь между ПНБ и низкой массой тела при рождении в проспективных исследованиях влияния указанных факторов на перинатальные осложнения требует учитывать количество и типы (выкидыш в середине цикла) предыдущих потерь.

### ФАКТОРЫ ОБРАЗА ЖИЗНИ

Как упоминалось ранее, ряд факторов, характеризующих образ жизни: ожирение, профессиональная деятельность, злоупотребление алкоголем и кофе, субфертильность, — могут выступать в качестве факторов риска

**сохранения желтого тела.** После удаления матки у коров и лошадей выброс простагландина  $F_{2\alpha}$  прекращается, что приводит к длительной персистенции желтого тела. Это объясняет тот факт, что наличие продуктов зачатия фактически предотвращает развитие лютеолиза<sup>7</sup>. Однако наличие самого эмбриона не является необходимым для этого. Например, инъекции ХГЧ могут до определенного предела продлить время существования желтого тела. Но, для того чтобы эмбрион смог прикрепиться к эндометрию матки, он должен быть жизнеспособным. Таким образом, **распознавание беременности и успешная имплантация происходят до персистенции желтого тела**, что позволяет предположить **отсутствие связи между желтым телом и формированием иммунологической толерантности.**

### **ГЕНОМНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ РАСПОЗНАВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ ОРГАНИЗМОМ МАТЕРИ**

Данные последних исследований показывают, что эмбрион экспрессирует геном уже на стадии двух клеток. Таким образом, на самых ранних стадиях развития эмбрион частично или полностью становится неидентичным организму матери. В связи с этим необходимо развитие блестящей оболочки, выступающей в качестве защиты от неблагоприятных окружающих факторов со стороны организма матери. Недавно было обнаружено, что у эмбриона в предимплантационной стадии наблюдается значительное подавление экспрессии генов в сравнении с неоплодотворенной яйцеклеткой<sup>8</sup>. *Down*-регуляция оказывает защитное действие, снижая уязвимость эмбриона. В преимущественно анаэробной среде отключение ненужных на данный момент времени функций, которые не являются необходимыми для выживания, может быть выгодным. Кроме того, несколько генов, которые активируются в этот момент, могут играть важную физиологическую роль. Раннее распознавание беременности организмом матери могут обеспечивать **новые гены, которые экспрессируются на очень ранних сроках эмбриогенеза**<sup>9</sup>.

### **КАК РАЗВИВАЕТСЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ЭМБРИОНУ?**

Зрелая яйцеклетка после овуляции достигает ампулярного отдела маточной трубы и сохраняет жизнеспособность в течение **12–24 ч** при отсутствии оплодотворения. **Шанс оплодотворения составляет 1:3.** После того как сперматозоид проникает в оболочку яйцеклетки, она становится «невидимой» для иммунной системы матери. Как и ожидалось, после слияния яйцеклетки и сперматозоида иммунные реакции отторжения со стороны организма матери не развиваются до того момента, пока не изменятся характеристики мембраны яйцеклетки (начинается экспрессия чужеродных антигенов). После развития экспрессии чужеродных антигенов вокруг оплодотворенной яйцеклетки быстро формируются блестящая оболочка, прочный и непроницаемый барьер для защиты от иммунных клеток матери. Кроме того, иммунную защиту обеспечивают клетки яйценосного бугорка, которые дополнительно предупреждают прямой доступ клеток иммунной системы матери к эмбриону. Тем не менее **клетки яйценосного бугорка** сохраняются в течение всего нескольких дней после оплодотворения, так как их основная функция заключается в обеспечении **транспорта эмбриона по маточной трубе по направлению к матке.** Бугорок имеет иммунные клетки, секретирующие цитокины, которые могут

служить первой системой передачи сигнала эмбриона<sup>10</sup>. Было показано, что в течение первых 8 ч после оплодотворения в периферической крови мышей отмечается снижение количества тромбоцитов<sup>11</sup>.

Пролиферация эмбриональных клеток до восьмиклеточной стадии протекает чрезвычайно упорядоченно. Бластомеры — тотипотентные клетки (т.е. каждая из них может развиваться в полноценный эмбрион). Этот процесс продолжается на протяжении около 3 дней, в то время как эмбрион перемещается в просвете маточной трубы. Скорость развития является хорошим показателем для оценки развития эмбриона и прогнозирования успеха имплантации.

### ОПЫТ, ПОЛУЧЕННЫЙ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Успехи, достигнутые при развитии нормальной беременности и рождении живого потомства с использованием эмбрионов донора у млекопитающих и межвидовом переносе эмбриона, демонстрируют эффективность этих двух процедур, что поддерживает мнение о том, что эмбрион является саморегулирующейся единицей. Успех беременности зависит от эффективности передачи сигналов эмбриона и последующего адекватного ответа организма матери. После оплодотворения эмбрион активно сигнализирует о своем наличии хозяйину (матери). Проводятся исследования по уточнению времени появления сигналов и специфических механизмов их передачи<sup>12, 13</sup>. Безусловно, передача сигнала должна происходить до активации генома эмбриона. В то время как при зачатии естественным путем наличие сперматозоидов и их компонентов, активирующих иммунной системой, в организме матери четко определено, при использовании вспомогательных репродуктивных технологий этого не происходит. После переноса эмбриона до момента имплантации проходит 4–5 дней, что указывает на наличие временного промежутка между появлением эмбриона и его распознаванием организмом матери. Задержка имплантации подразумевает, что это время необходимо для развития иммунологической толерантности и подготовки эндометрия, развития его рецептивности и восприимчивости к имплантации эмбриона. При репродукции без использования вспомогательных репродуктивных технологий наблюдается аналогичная задержка имплантации (на 5–7 дней). В обоих случаях предполагается, что **продуцируемые эмбрионом сигналы обеспечивают ответ организма матери на его наличие**.

Более того, эксперименты с переносом эмбрионов донора (генетически отличающихся) показали высокую частоту успешной имплантации и наступления беременности, что указывает на важную роль эмбриона в процессе распознавания. Имплантация может происходить за пределами матки, в том числе в маточных трубах, яичнике или даже (редко) в брюшной полости (кишечник). Случаи возникновения внематочной беременности подтверждают, что распознавание беременности организмом матери является системным процессом, а не локализованным исключительно на уровне матки, и лишь эмбрион способен вызывать его. Однако роль эндометрия в успехе репродукции по-прежнему очень важна, поскольку большинство успешных беременностей развивается именно в полости матки.

Аутокринные сигналы эмбриона первоначально зависят от успешного слияния яйцеклетки и сперматозоида, которые несут нормальный набор хромосом. Как при использовании вспомогательных репродуктивных технологий,

так и без их участия сперматозоиды определяют дальнейшее развитие. Несмотря на то что производимые матерью биологически активные вещества проникают через блестящую оболочку, они имеют ограниченный доступ непосредственно к эмбриону и поэтому воздействуют на зиготу незначительно<sup>14</sup>. Таким образом, эмбрион производит больше сигналов, чем получает, и блестящая оболочка способствует самостоятельному развитию эмбриона и дифференцировке эмбрио- и трофобласта. Важность аутокринных сигналов эмбриона показана в различных экспериментальных моделях с использованием питательных сред, не содержащих факторов роста, когда оплодотворенный эмбрион самостоятельно сохраняет способность достигать стадии бластоцисты. Для оценки влияния различных веществ на развитие эмбриона и в целях выявления материнских факторов, играющих роль в росте и дифференцировке эмбриона, использовались несколько моделей культур клеток. Целью было определение материнских и неэмбриональных специфических веществ. Рецепторы инсулиноподобного фактора роста у эмбриона и ИФР-лиганды (ИФР — инсулиноподобный фактор роста) оказывают трофическое влияние, которое модулируется инсулиноподобным фактором роста-3 эмбриона<sup>15–21</sup>. Процесс имплантации очень сложен. После прямого контакта матери и эмбриона начинается координированное взаимодействие огромного количества процессов (или составляющих).

## ВЕЩЕСТВА, УЧАСТВУЮЩИЕ В ПОДГОТОВКЕ ЭНДОМЕТРИЯ К ИМПЛАНТАЦИИ И РАЗВИТИЮ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ

Увеличение количества регуляторных Т-клеток ( $T_{reg}$ ,  $CD4^+/CD25^+$ ) перед имплантацией свидетельствует о том, что эмбрион на ранних стадиях оповещает организм матери о **возможной имплантации независимо от наличия спермы в организме матери**, так как подобный эффект отмечается и при использовании экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Во время беременности баланс цитокинов смещается в сторону Th2-типа иммунного ответа (иммунотолерантного): увеличивается вдвое количество интерлейкина-4 (ИЛ-4), ИЛ-5 и ИЛ-10 на фоне супрессии уровня цитокинов Th1-типа, таких как ИЛ-2, интерферон- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ) и фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ )<sup>3,22</sup>. Избыточная же продукция цитокинов Th1-типа связана с риском нарушения развития беременности<sup>23</sup>. Активация НК-клеток обуславливает возникновение Th1-типа иммунного ответа, в то время как увеличение экспрессии рецепторов к прогестерону на Т-лимфоцитах периферической крови способствует сохранению беременности путем увеличения продукции ИЛ-10 и трансформирующего фактора роста- $\beta$  (ТФР- $\beta$ )<sup>24</sup>. В этот процесс могут вовлекаться другие, более специфические для периода отсутствия беременности вещества: половые стероиды, интегрины и ИЛ-1 $\beta$ , которые не содержат матричную рибонуклеиновую кислоту (мРНК) для рецепторов у эмбриона. Кроме того, вовлекаются фактор ингибирования лейкемии и колониестимулирующий фактор (КСФ), которые стимулируют матриксные металлопротеиназы (ММП) и ингибируют экспрессию MUC-1 на поверхности эндометрия, что облегчает имплантацию<sup>25,26</sup>. НК-клетки также могут ингибировать избыточную инвазию трофобласта путем определения необычных лигандов

главных комплексов гистосовместимости (*Major Histocompatibility Complex* — МНС) в трофобласте плода<sup>23</sup>. Однако **ни одно из указанных выше соединений не является специфичным** для беременности и поэтому не может быть первичным сигналом для развития иммунологической толерантности.

Неполноценность имплантации, которая встречается достаточно часто, нарушает хрупкий баланс между эндометрием, который подвергается децидуальным изменениям, и эмбрионом. Ранее были проведены исследования адаптации эндометрия к эмбриону в момент имплантации<sup>27–31</sup>. Важно понять, является ли эндометрий сенсором для исключения имплантации патологических эмбрионов или же аномальные эмбрионы сами не в состоянии генерировать необходимые сигналы для эффективной имплантации. Новые данные свидетельствуют о том, что последний вариант может быть более правдоподобным. Кроме того, было высказано предположение, что при переносе двух эмбрионов в полость матки один из них может поддерживать имплантацию другого, с более низким качеством. Эти данные свидетельствуют о том, что **эндометрий, как и эмбрион, активно участвует в обеспечении процесса успешной имплантации.**

Эндометрий может создавать неблагоприятные условия для имплантации в связи с агрессивным состоянием местных иммунных механизмов, обусловленных высоким уровнем НК-клеток в периферической крови, нарушением гормональной подготовки к имплантации, инфекциями и сниженной экспрессией интегринов. Роль АФА в развитии неполноценной имплантации все еще обсуждается<sup>32</sup>. Нарушение имплантации может быть обусловлено недостаточной экспрессией молекул адгезии, а также недостаточным уровнем секреторных или клеточных факторов, которые способствуют иммунологическому распознаванию беременности организмом матери<sup>33</sup>. Кроме того, возможна частичная или временная имплантация эмбриона с последующим перемещением в маточную трубу, что приводит к развитию внематочной или биохимической беременности. Последние данные показывают, что у пациенток с неполноценной имплантацией наблюдается иммунный дисбаланс со смещением в сторону преобладания стимуляции рецепторов НК-клеток над их угнетением. Отмечается снижение экспрессии ингибиторных рецепторов CD158a и CD158b в НК-клетках CD56dim/CD16<sup>+</sup> и CD56bright/CD16<sup>+</sup>, в то время как экспрессия активирующих рецепторов CD161 в НК-клетках CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> у пациенток с нарушением имплантации увеличивается<sup>34</sup>.

## УНИКАЛЬНЫЕ ФЕНОМЕНЫ ТРЕБУЮТ УНИКАЛЬНЫХ СИГНАЛОВ

Для успешного получения потомства при имплантации эмбриона, имеющего на 50 или 100% чужеродный геном (и даже при межвидовой пересадке эмбриона), необходимы уникальные сигналы, исходящие от эмбриона к организму матери. Однако развитие иммунологической толерантности является условным, так как отторжение эмбриона или плода может произойти на любом этапе до родоразрешения. Для того чтобы продуцировать такой специфический сигнал, эмбрион должен быть жизнеспособным, а организм матери — обладать способностью к его восприятию. Сигнал должен экспрессироваться на ранних этапах развития эмбриона, быть мощным и иметь специфические места приложения и в иммунной системе матери, и в эндометрии.

**Сигнал должен быть универсальным для всех млекопитающих**, потому что для них характерен этот феномен на ранних этапах развития эмбриона (а все многообразие возникает только на этапе имплантации).

Какие свойства должен иметь такой сигнал? Он должен модулировать иммунную систему матери, не подавляя ее. Это важно, так как мать во время беременности подвергается воздействию патогенов, и способность поддерживать эффективный иммунный ответ для борьбы с заболеваниями необходима для выживания как женщины, так и эмбриона. Таким образом, иммунная система матери должна беспрепятственно функционировать и бороться с патогенами и при этом оставаться толерантной к эмбриону. Интенсивность сигнала не должна быть чрезмерной и снижающей способность организма матери отторгать дефектные эмбрионы или плод с тяжелой внутриутробной инфекцией. Сигнал должен быть направлен на эндометрий, создавая условия для благоприятной имплантации эмбриона. И, наконец, взаимодействие в системе «эмбрион—мать» имеет динамический характер. Сложные механизмы в первую очередь направлены на **поддержание толерантности**, а не ее инициации, что является основной темой данной главы.

Доказательством того, что эмбрион играет активную роль в иммунологическом распознавании, являются исследования, демонстрирующие иммуносупрессивные свойства питательной среды, обогащенной эмбриональными клетками<sup>35,36</sup>. Однако биологически активные вещества, ответственные за этот процесс, охарактеризованы не до конца.

Основной диагностический маркер беременности у человека — ХГЧ, однако его уровень не отражает жизнеспособность беременности, поздно обнаруживается в культуре эмбриональных клеток и длительно персистирует в кровотоке после окончания беременности, что резко ограничивает его клиническое значение. ХГЧ играет важную роль в поддержании функции желтого тела, а после имплантации участвует в изменении биохимических и морфологических особенностей клеток эндометрия, воздействуя на специфические участки связывания (CG/LH-R). Кроме того, есть данные о роли ХГЧ в формировании местного иммунитета<sup>37</sup>. Тем не менее ХГЧ не является специфическим для беременности веществом, уникален только для человека и, что очень важно, выявляется при различных видах злокачественных онкологических заболеваний. Большинство биологических эффектов ХГЧ направлены на сохранение беременности во время имплантации и на более поздних сроках гестации.

### **ФАКТОР АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ**

Фактор активации тромбоцитов является ацетилированным фосфоглицеридом, экспрессируемым как у человека, так и у грызунов. Его роль в основном ограничивается локальным воздействием на просвет маточной трубы, обеспечивающим транспорт эмбриона в полость матки<sup>38</sup>. У других видов сходную роль играют другие биологически активные вещества. Например, у лошадей морула секретирует простагландин Е (ПГЕ). Фактор активации тромбоцитов также оказывает трофическое влияние на эмбрион<sup>39</sup>. **Фактор активации тромбоцитов не является специфическим для беременности веществом** и вне гестации обнаруживается в тромбоцитах, лейкоцитах и клетках эндотелия. Таким образом, фактор активации тромбоцитов не может быть уникальной сигнальной субстанцией, необходимой для развития иммунологической толерантности во время беременности.