

TARTU ÜLIKOOL  
Arstiteaduskond  
Anatoomia instituut

Piret Männik

**Endomeetriumi epiteelirakkude muutused viljatutel  
patsientidel korduvate ebaõnnestunud IVF  
protseduuride korral**

Magistritöö biomeditsiini alal

Juhendajad: dotsent Marina Aunapuu  
professor Andres Arend

Tartu 2010

# SISUKORD

<b>1. KASUTATUD LÜHENDID</b>	4
<b>2. SISSEJUHATUS</b>	5
<b>3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b>	7
3.1. Reproduktiivtervis ja viljatus	7
3.2. Tubaarne infertiilsus	8
3.3. Endomeetriumi morfoloogia	9
3.4. Munajuha morfoloogia	11
3.5. Munajuha ja endomeetriumi epiteel	11
3.6. Menstruaaltsükkel	12
3.7. Kollaskeha	14
3.8. Pinopoodid	15
3.9. Mutsiinid	16
3.9.1.MUC1 ja MUC16	17
3.10. Trofiniin	18
3.11. Integriin $\beta_3$	20
<b>4. TÖÖ EESMÄRK</b>	22
<b>5. EKSPERIMENTAALNE OSA</b>	23
5.1. Materjal ja meetodika	23
5.2. Histoloogia	23
5.3. Immunohistokeemia	23
5.4. Skaneeriv elektronmikroskoopia	24
5.5. Östradioli ja progesterooni määramine	24
5.6. Statistiline analüüs	25
5.7. Magistrandi osalus	25

<b>6. TULEMUSED</b>	26
6.1. Ultraheli	26
6.2. Histoloogia	26
6.3. Immunohistokeemia	27
6.4. Skaneeriv elektronmikroskoopia	28
6.5. Östradioli ja progesterooni seerumitasemed	28
<b>7. ARUTELU</b>	30
<b>8. JÄRELDUSED</b>	36
<b>9. KOKKUVÕTE</b>	37
<b>10. SUMMARY</b>	38
<b>11. KASUTATUD KIRJANDUS</b>	39
<b>12. TÄNUAVALDUSED</b>	46
<b>13. LISAD</b>	47
13.1. Histoloogiliste uuringute joonised	47
13.2. SEM uuringute joonised	49
13.3. Immunohistokeemiliste uuringute joonised	52

## 1. KASUTATUD LÜHENDID

DAB –3,3`-diaminobensidiin

FSH – folliikuleid stimuleeriv hormoon

GnRH -gonadotropiini vabastav hormoon (*Gonadotrophin Releasing Hormone*)

hCG – inimese kooriongonadotropiin

HRT e. HAR - hormonaalne asendusravi (*Hormonal Replacement Treatment*)

HSP – kuumašokivalk (*Heat Shock Protein*)

H&E – hematoksüliin–eosiin värving

IH - immunohistokeemia

IVF - *in vitro* viljastamine (*In Vitro Fertilization*)

LH – luteiniseeriv hormoon

MUC - mutsiinid

PBS – fosfaatpuhver (*Phosphate Buffered Saline*)

PID - väikevaagna elundite põletikuline haigus (*Pelvic Inflammatory Disease*)

POF- enneaegne ovariaalne puudulikkus (*Premature Ovarian Failure*)

PPR – *Pattern Recognition Receptors*

SEM – skaneeriv elektronmikroskoopia

STLH e. STD - seksuaalsel teel leviv haigus (*Sexually Transmitted Disease*)

TFI - tubaarne viljatus (*Tubal Factor Infertility*)

WOI - implantatsiooni aken (*Window of Implantation*)

## 2. SISSEJUHATUS

Viljatus on laialdane rahva tervise probleem, mis puudutab maailmas kuni 15% paaridest [1]. Uuringutest on selgunud, et viljatus võib mõjutada paaride igapäevaelu, tekitada tõsist rahulolematust enda ja oma elukaaslase suhtes. Oma probleemiga pöörduvad aga ainult ligikaudu pooled viljatud paarid arsti vastuvõtule.

Fertiilsus ehk viljakus tähendab naise võimet rasestuda ja sünnitada elus laps. Siiski on umbes 10%-20% reproduktiivses eas paaridest võimetud vähemalt aasta kestnud regulaarse suguelu järel tekitama rasedust. Sellist olukorda, kus esineb võimetus eostada, rasestuda, rasedust lõpuni kanda või sünnitada eluvõimelist last nimetataksegi viljatuseks ehk infertiilsuseks.

Viljatuse võivad põhjustada nii naise kui ka mehe tervisest tingitud probleemid. Naiste viljatuse põhjuseid on mitmeid, neist olulisemad on ovulatsioonist tingitud hormonaalsed häired (munaraku küpsemise ja irdumise häired), kollaskeha puudulikkus, erinevad munajuhade patoloogiad ja emaka limaskestast kvaliteedi probleemid. Umbes viiendik naistest on viljatud näilise põhjuseta ja siin kahtlustatakse autoimmuunseid mehhanisme [2]. Üks selliseid põhjuseid on näiteks varajane ovariaalne puudulikkus (POF), mille põhjuseks arvatakse autoimmuunset rünnakut munasarjade vastu või ka geneetilist häiret.

TFI e. tubaarne infertiilsus seletab umbes 20-25 % naiste viljatust. Siia alla kuuluvad naised, kellel on täielikult umbunud munajuhad ja ka need, kellel on ainult üks munajuha blokeerunud – toimunud juha armistumine (ja selle tagajärjel kootumine) või mõni muu tuubal kahjustav faktor. Enamik munajuha funktsioonihäireid on põhjustatud tuuba infektsiooni episoodidest (PID) või endometriosisist.

Suure läbimurde viljatuse ravis tõi kaasa kehaväline viljastamine ja 1978. aastal Suurbritannias sündinud esimene nn. katseklaasilaps. Tänapäeval tehakse Euroopas 230 000 kehavälise viljastamise protseduuri aastas ja 1–3% vastsündinutest on sündinud sellel viisil. Eestis on kehaväline viljastamine olnud lastetuse ravis kasutusel 10 aastat. Eesti kehavälise viljastamisega tegelevates neljas kliinikus viiakse aastas läbi 450 protseduuri, mis on 1 miljoni elaniku kohta 350 IVF-protseduuri. Eestis sünnib ligikaudu 100 IVF-last aastas, mis moodustab 0,8% kõigist vastsündinutest [3].

Kuigi viljastumisest ja implantatsioonist on palju teada juba alates 19. sajandi alguse Karl Ernst von Baer'i aegadest, puudub siiski põhjalikum ja korrastatud süstemaatiline ülevaade erinevate markerite tähtsusest selles protsessis. Loote pesastumine sõltub tervest reast nii embrüo kui ka platsenta poolsetest koordineeritud sündmuste jadast. Kuigi implantatsioonis osalevate üksikute markerite kohta on praeguseks palju teada, puudub siiski põhjalik ülevaade terve

protsessi dünaamikast ning erinevate markerite tähtsusest selles. Histoloogiline uurimine ja hematoksüliin-eosiin värving endomeetriumi bioptaadidest ning selle retseptiivsuse hindamine on kuldstandard, kuid siiski ei kata sealt saadav informatsioon kliinilisi vajadusi implantatsiooni põhjalikumaks uurimiseks. Käesolevas töös uuritakse histoloogiliste meetoditega ja analüüsitakse retseptiivse endomeetriumi apositsioonis (pinopoodid, MUC1, MUC16) ja adhesioonis (integrin  $\beta_3$ , trofiniin) osalevate markerite lokalisatsiooni ning tähtsust IVF patsientide endomeetriumi biopsiate epiteelirakkudes.

### 3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

#### 3.1. Reproduktiivtervis ja viljatus

Reproduktiivtervis on täieliku füüsilise, vaimse ja sotsiaalse heaolu seisund inimese reproduktiivsüsteemi vallas. Selle definitsiooniga täheldatakse inimeste võimelisust elada rahuldust pakkuvat ja turvalist seksuaalelu ning inimeste võimelisust saada lapsi ja olla vabad otsustama, kas, millal ja kui sageli lapsi saada [4].

Viljatus on täiskasvanud inimeste jaoks oluline probleem, mis tekitab pingeid paarivahelistes suhetes, mõjutab partnereid nii emotsionaalselt kui psühholoogiliselt. Mitteametlikel andmetel on Eestis üle 20000 viljatu paari [5], mis mõjutab negatiivselt riigi niigi madalat iivet. Naistel tähendab infertiilsus võimetust rasestuda. See on olukord, kus paaril ei ole vähemalt aasta kestnud regulaarse suguelu (kasutamata rasestumisvastaseid vahendeid) järel tekkinud rasedust. Seejuures eristatakse primaarset ja sekundaarset infertiilsust. Primaarne infertiilsus tähendab olukorda, mille korral ei ole naine vaatamata soovile kunagi rasestunud. Sekundaarse infertiilsuse all mõistetakse olukorda, kus naisel on olnud rasedusi ja sünnitusi, kuid viimase 1-2 aasta jooksul ei ole ta rasestunud või on olnud nurisünnitused [6]. Üheks tähtsamaks lastetuse ravi edukust mõjutavaks teguriks on naise vanus ning paari lastetuse põhjus. Lastetus sageneb naise eluea suurenedes ja on 20-25-aastastel umbes 6%, 30-35-aastastel 16% ja 40-45-aastastel 40% [1]. Füsioloogilised viljatuse perioodid on naisel umbes ühe aasta jooksul pärast menarchet, sünnitusjärgselt, laktatsiooni ajal ja ka enne menopausi.

Naiste viljatuse põhjuseid võib jaotada kliiniliste uuringute põhjal neljaks grupiks. Kõige enam (30%) on viljatus põhjustatud ovulatsioonihäiretest. Viimased omakorda klassifitseeritakse põhjuse järgi kolme gruppi: hüpotalamo-hüpofüsaarne puudulikkus (st. hüpogonadism), hüpotalamo-hüpofüsaarne düsfunktsioon (sh. krooniline oligo-/anovulatsioon on naiste levinuim viljatuse põhjus) ja ovariaalne puudulikkus e. hüpergonadotroopne hüpogonadism. Munajuhade kahjustustest ja endometriosisist võib olla tingitud kummastki 20% viljatust. Väiksemal määral (kuni 15%) mõjutavad viljatust ka erinevad emakakaela patoloogiad [5]. Uuringute põhjal esineb primaarset viljatust 3-6% ja sekundaarset viljatust 2-10% paaridest [7; 8].

Neuroendokrinoloogias on peamine roll hüpotalamusel ja hüpofüüsil ning nende omavahelisel regulatsioonil. Hüpotalamuse hormoonidest on viljakuse tagamiseks oluline GnRH (gonadotropiini vabastav hormoon), mis omakorda vabastab hüpofüüsi eessagarast gonadotroopsed hormoonid (LH, FSH). Lisaks hüpotalaamilisele stimulatsioonile, mõjutavad LH ja FSH vabanemist ka mitmed intrapituitaarsed peptiidid ja tagasiside gonaadidest. LH

peamine toime avaldub teeka-rakkudesse, soodustades androgeeni produktsiooni, mis aromatiseerumise käigus muutub omakorda östrogeeniks. Östrogeen soodustab aga *corpus luteumi* e. kollaskeha moodustumist ja progesterooni eritumist. FSH toimib granulosa-rakkudesse ja stimuleerib sellega folliikulite moodustumist ja östradioli produktsiooni. Olulist rolli adenohüpofüüsi hormoonidest mängib ka prolaktiin, mille retseptoreid on paljudes organites - rinnanääre, gonaadid, kopsud, maks, aju jne. [9] Prolaktiin on muuhulgas tähtis laktatsiooni stimuleerija ja emakakontraktsioonide käivitaja.

Emaka limaskesta histoloogilistele muutustele on oluline areneva folliikuli ja kollaskeha poolt produtseeritavad steroidhormoonid (östradiol, progesteron). Viljatuse põhjustena on hormonaalse tasakaalu nihked ja neist tulenevad menstruatsioonitsükli häired olulise tähtsusega. Enamikel juhtudel ei toimu munaraku küpsemist ja viljastumist, raseduse katkemist esineb oluliselt harvem. Menstruatsioonitsükli teises faasis toodab munasarjas paiknev kollaskeha progesterooni, mille toimel muutub emaka limaskest kohevamaks ja näärmeterohkemaks. Muutused limaskestas on eelduseks loote pesastumiseks limaskesta. Mõningatel juhtudel ei ole aga kollaskeha võimeline tootma progesterooni küllaldasel määral, mis viib limaskesta puudulikkusele ning seetõttu ei ole embrüo suuteline ka pesastuma. Kollaskeha vaegtalitus on sageli tingitud munaraku halvast arengust. Kliiniliselt diagnoositud raseduse katkemise korral on embrüo pesastumine toimunud, kuid mingil põhjusel ei kasva ta enam edasi (on arvatud, et põhjuseks võiks olla rasedusaegse kollaskeha vaegtalitus, mille puhul progesterooni ei toodeta piisaval määral).

On ka olukordi, mille korral on defekt limaskestas endas - limaskest ei ole suuteline rasedust vastu võtma vaatamata progesterooni küllaldasele tasemele.

### **3.2. Tubaarne infertiilsus**

Naise viljatuse üheks peamiseks põhjuseks on mittefunktsioneerivad munajuhad. Munajuhade patoloogiatest on tähtsaimal kohal tubaarne viljatus e. TFI (*Tubal Factor Infertility*) [2], mille korral esineb munajuhade sulgus. See võib olla erinev: ühe- või mõlemapoolne; osaline või täielik, proksimaalne või distaalne munajuhade sulgus. TFI peamiseks põhjuseks on väikevaagna elundite põletikulised haigused (PID e. *Pelvic Inflammatory Disease*), mille põhjusteks on omakorda sugulisel teel levivate haiguste (STLH e. STD) läbipõdemine. Viimastest enamlevinud on *C. trachomatis*’e infektsioon ehk genitaalne klamüüdiis. Umbes 70-80% klamüüdia-infektsioonidest naistel kulgevad asümptomaatiliselt, mis suurendab omakorda nakkuse püsimist ja normaalsete struktuuride kahjustumist [10; 11].



*C. trachomatis* on sugulisel teel leviv rakusisene parasiit, mille infektsioon saab alguse patogeeni kontaktist suguteede limaskestadega. *C. trachomatis* vallandab peremeesorganismi immuunsüsteemi vastuse, mille eripärast sõltub infektsiooniga võitlemise edukus ning võimalike patoloogiliste tüsistuste ulatus. Infektsiooni algetapis osalevad organismi vastuses kaasasündinud immuunsüsteemi rakud, interakteerudes mikroobidega PPR (*Pattern Recognition Receptors*) retseptorite vahendusel [2]. Teised levinud PID`ide põhjustajad on *N. gonorrhöa* ja bakteriaalne vaginosis (so. düsbiootiline seisund).

Munajuhade tööd võivad häirida ja seega ka viljakust alandada põletikejärgsed liited kõhukoopas. Soolestiku ja seesmiste suguelundite vaheliste liidete teket võivad põhjustada perforatsioonid ussipikupõletik või mõnel muul põhjusel tekkinud kõhukelmepõletik ehk peritoniit. Sama tulemuseni võib viia ka endometrioos. Munajuhade kaasasündinud anomaaliaid esineb harva [1].

Tubaarset obstruktsiooni diagnoositakse peamiselt laparoskoopia või hüsterosalpingograafia abil. Munajuhade kahjustus ja tubaarse viljatuse kujunemine sõltub ka autoimmuunse põletiku tekkest. Klamüdioosi korral on aktiveeritud kuumašokivalkude (HSP e. *Heat Shock Protein*) süntees, mis omakorda põhjustab autoimmuunse põletikulise vastuse. Autoimmuunse geneesiga endomeetriumi põletikuline kahjustus ei lase embrüol implanteeruda, mistõttu IVF-ravi tulemused TFI patsientidel on võrdsed teiste viljatute paaride omaga, vaatamata sellele, et munajuhade läbimatus ei tohiks mõjutada implanteerumist [2].

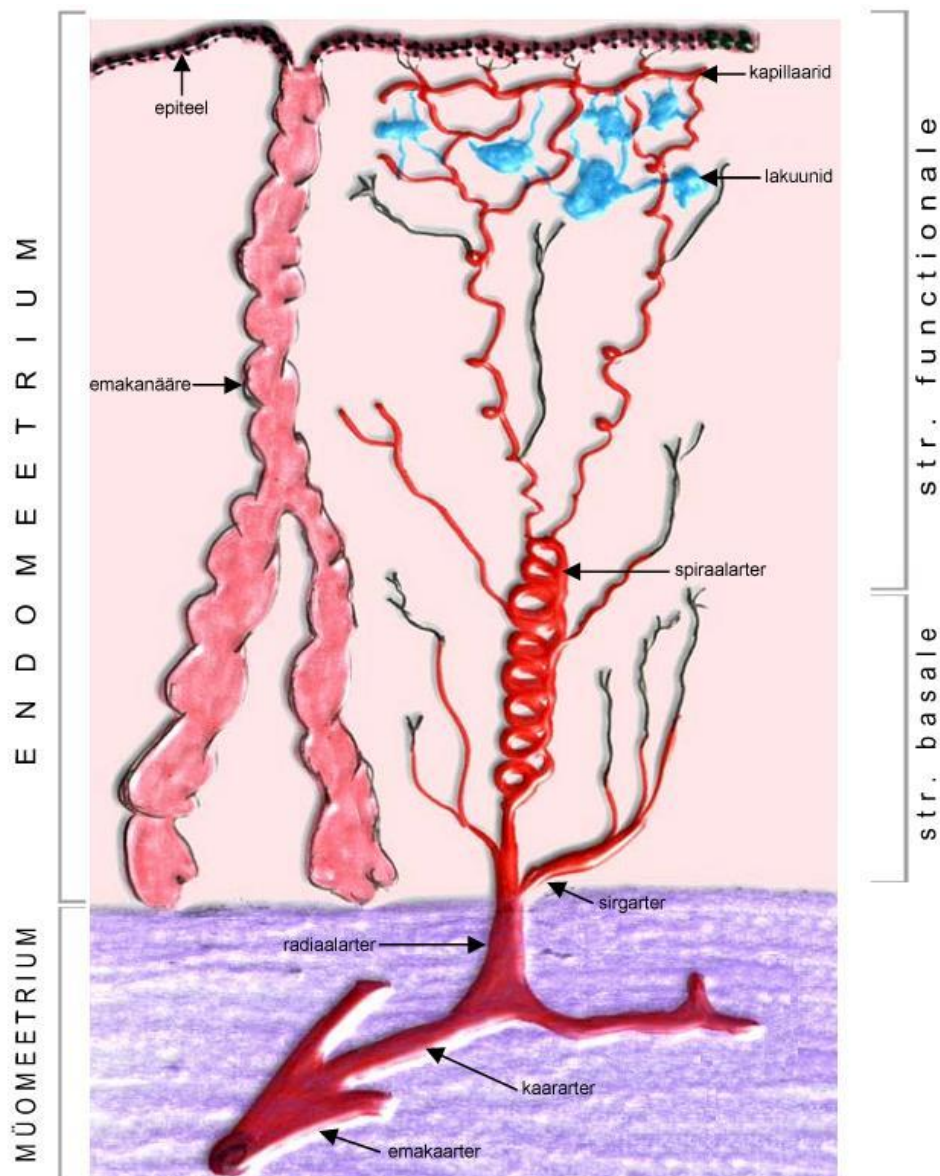
Erinevalt paljudest teistest viljatuse põhjustest on munajuhade sulgusest tingitud naisepoolset viljatust võimalik täielikult vältida. Samuti on varasemad uuringud näidanud, et tubaarse viljatuse raskete vormide korral võivad lastetuse ravi tulemused olla keskmisest halvemad. Siiski on tubaarse viljatuse patogenees veel küllaltki selgusetu. Võttes arvesse tubaarse viljatuse laialdast levikut ning selle probleemi negatiivset mõju lastetuse ravi tulemustele on oluline mõista tubaarse viljatuse patogeneesi mehhanisme ning lastetuse ravi rasedustulemusi mõjutavaid faktoreid.

Tubaarse viljatusega patsientide raviks kasutatakse sageli *in vitro* viljastamist (IVF). IVF-i käigus viljastatakse ootsüüdid *in vitro* tingimustes, järgnevalt toimub embrüode inkubeerimine 2-4 päeva jooksul ning 1-3 embrüo siirdamine emakasse.

### **3.3. Endomeetriumi morfoloogia**

Emakas (*uterus*) on lihaselise ehitusega õõnesorgan, mis jaguneb kolmeks osaks: emakapõhi, emakakeha ja emakakael. Emakasein koosneb kolmest kestast: limaskestast e endomeetriumi (*tunica mucosa corporis uteri*), lihaskestast e müomeetriumi (*tunica*

*muscularis*) ja välimisest serooskestast e perimeetriumist (*tunica serosa*). Organi sisepinda vooderdab ühekihiline prismaatiline epiteel (*epithelium simplex columnare*), mille moodustavad ripsmetega ja ripsmeteta rakud. Epiteeli alla jääb rakurohke sidekoeline proopria (*lamina propria mucosae*), kus paiknevad rohkearvulised emakanäärmed (*glandula uterinae*). Fertiilses eas naistel jaguneb endomeetrium kaheks kihiks: basaalkihiks (*stratum basale endometrii*) ja funktsionaalkihiks (*stratum functionale endometrii*). Funktsionaalkiht on hormoon-tundlik ja allub igakuistele tsüklilistele muutustele - proliferatsioon, sekretsioon, nekroos ja irdumine. Funktsionaalkihi koosseisu kuuluvad ning kasvavad igakuiselt koos sellega ka spiraalarterid, mis näitavad endomeetriumi küpsust (tsükli lõpus on neid rohkearvuliselt). Basaalkiht ei irdu menstruatsioonil ja on aluseks funktsionaalkihi regeneratsioonile (Skeem 1).



Skeem 1. Endomeetriumi skemaatiline ehitus (modifitseeritud Ross & Pawlina 2006 järgi) [12].

Emaka limaskestast areng on keeruline protsess, mille käigus muutuvad endomeetriumi omadused, et saaks võimalikuks embrüo implantatsioon [13]. Implantatsioon toimub raseduse varases faasis, kus embrüo kinnitub emaka seinale. Selles staadiumis nimetatakse embrüot blastotsüstiks. Implanteerumise eesmärk on embrüole vajalike toitainete ja hapniku omastamine emalt, et ta saaks kasvada. Implantatsiooni võimaldamiseks läbib endomeetriumi rida muutusi. Emaka limaskestast on retseptiivne 6-8 päeva pärast ovulatsiooni. Endomeetriumi on võimeline embrüo implantatsiooniks suhteliselt lühikest aega - seda nimetatakse antud ajaperioodi implantatsiooni aknaks (WOI e. *Window of Implantation*) [14; 15], mis kestab ligikaudu neli päeva, menstruaaltsükli 20.-24. päevani. Olulist rolli retseptiivse endomeetriumi tekkes mängib progesterooni stimulatsioon ning WOI algab ja lõpeb vastavalt 6 ja 9-10 päeva pärast progesterooni toime algust [16]. Progesterooni olulisust tõestavad progesteroonivastased ained (näiteks mifepristoon [RU-486]) ja tema derivaadid, mis konkureerides progesterooni retseptorile endomeetriumis blokeerivad hormooni sidumise. Progesterooni sidumise pärssimine väldib implantatsiooni ja seeläbi sulgub ka implantatsiooni aken.

Seega edukas implantatsioon nõuab retseptiivse endomeetriumi olemasolu, normaalset ja edukat embrüo implanteerumist blastotsüsti staadiumis ning ema ja loote kudede täielikku sobivust [17; 18]. Blastotsüsti implantatsioon viiakse lõpule teise embrüonaalarengu nädala jooksul. Süntsüüsiotrofoblast tungib endomeetriumi sidekoelisse stroomasse ja blastotsüst pesastub aeglaselt endomeetriumis, jätkates edasist arengut. Stroomarakud implanteerumiskoha ümber omandavad polüeedrilise kuju ja muutuvad glükogeeni- ja lipiididerikasteks detsiduaalrakkudeks. Nende ülesanne on olla ilmselt embrüo toitallikaks.

### **3.4. Munajuha morfoloogia**

Munajuha e. *tuba uterina* transpordib ootsüüdi munasarjast emakakeha valendikku ja on viljastumise kohaks. Organ on umbes 10-12 cm pikk ja ulatub laienenud avatud aluosast munasarja lähedal kuni kitsa osani, mis läbib emaka seina. Munajuhas eristatakse nelja segmenti: munajuhalehter (*infundibulum*), munajuhaampull (*ampulla*), munajuha kitsus (*isthmus*), emakaosa e. intramuraalne segment (*pars uterina*). Munajuhalehtrit ümbritsevad epiteeliga kaetud narmad (*fimbriae*). Ampullaarosa on munajuha kõige pikem segment moodustades kaks kolmandikku organi kogupikkusest ja just see osa on tavaliseks viljastumise kohaks. Munajuha sein koosneb kolmest kestast: limaskestast (*tunica mucosa*), lihaskestast (*tunica muscularis*) ja serooskestast (*tunica serosa*). Limaskestast vooderdav ühekihiline prismaatiline epiteel (*epithelium simplex columnare*) koosneb kahest rakutüübist:

ripsmetega rakud (*epitheliocytus ciliatus*) ja ripsmeteta sekretoorsed rakud (*exocrinocytus tubarius*). Limaskestas kurrud on kõige tugevamalt arenenud ampullaaros, kus nad moodustavad keeruka labürinditaolise kompleksi, samas munajuha kitsuse osas muutuvad kurrud oluliselt madalamaks. Lihaskest koosneb kahest kihist: sisemine tsirkulaarne (*stratum circulare*) ja välimine pikikiht (*stratum longitudinale*), emaka lähedal lisandub kolmas tsirkulaarne lihaskiht [19].

### **3.5. Munajuha ja endomeetriumi epiteel**

Nagu eespool näidatud voorderab munajuhaid ja katab ka endomeetriumi ühekihiline prismaatiline epiteel, kus esinevad nii ripsrakud kui ripsmeteta rakud. Ripsrakkude apikaalne pind on varustatud aktiivselt liikuvate ripsmetega, sekretoorsetes rakkudes esinevad spetsiifilised graanulid. Need rakuvormid kujutavad endast ühe ja sama rakutüübi erinevaid funktsionaalseid seisundeid [12], sest esineb ka rakke, kus võib näha mõlema rakutüübi tunnuseid [20]. Munajuha epiteelis on ripsrakud kõige arvukamad lehtri ja ampullaaros. Ripsmete löögi suund on munajuhas emaka suunas. Ripsmeteta rakke peetakse sekretoorseteks rakkudeks, mis toodavad toitaineterikast vedelikku ootsüüdi toitmiseks. Epiteelirakud tsükliliselt hüpertrofeeruvad follikulaarfaasis ja atrofeeruvad luteaalfaasis tingituna hormoonide (eeskätt östrogeenide) tasemete muutustest menstruaaltsükli. Samuti muutub ripsrakkude ja ripsmeteta rakkude vahetult enne ovulatsiooni algust [12]. On näidatud, et ripsrakkude löögisagedus suureneb oluliselt pärast ovulatsiooni [21] ja on kiirem sekretoorses faasis võrreldes proliferatiivse faasiga [22].

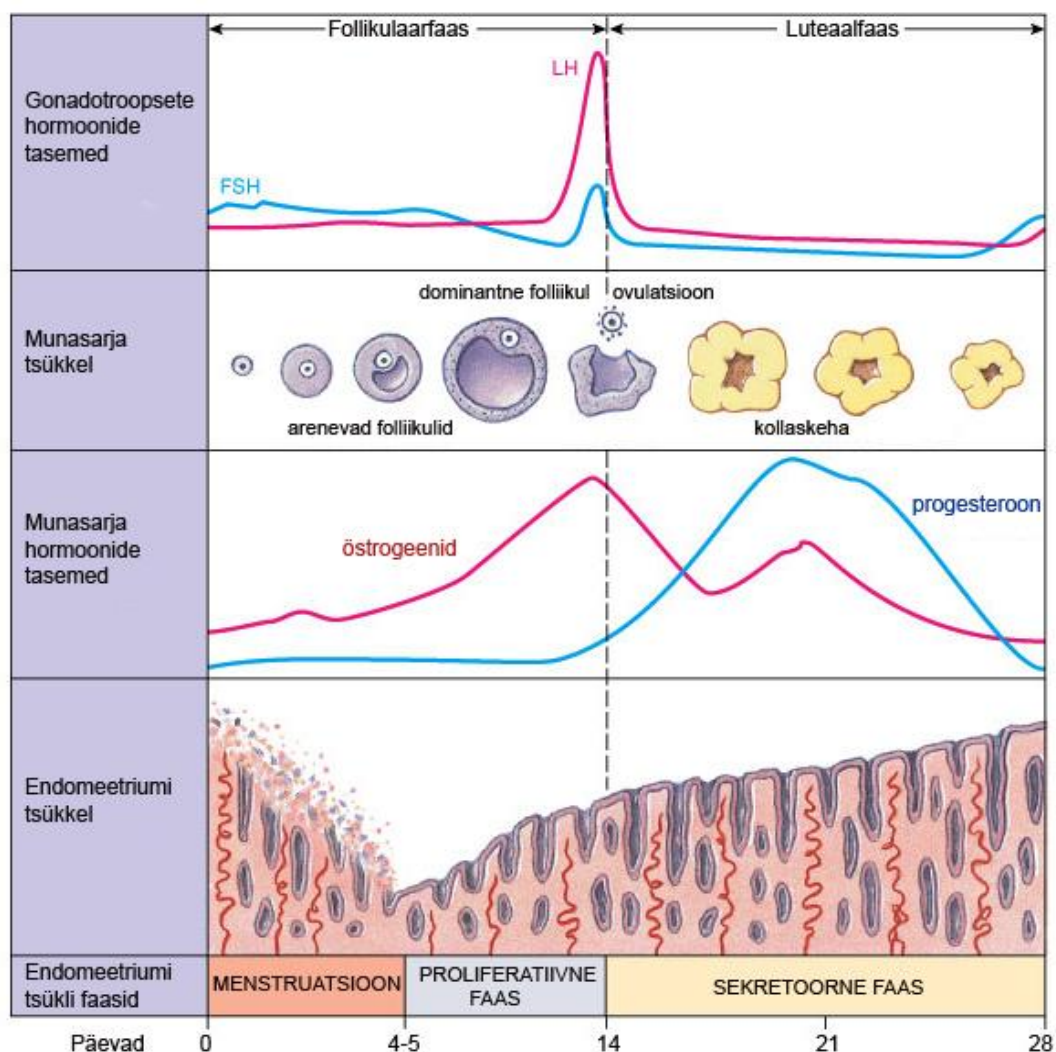
### **3.6. Menstruaaltsükkel**

Menstruaaltsükli jooksul toimub perioodiline endomeetriumi funktsionaalse kihi deskvamatsioon sellele järgneva regeneratsiooniga, mis lähtub säiluvast basaalkihist. Need endomeetriumi tsüklilised muutused on otseselt munasarja hormoonide – östrogeenide ja progesterooni - poolt mõjutatavad (Skeem 2). Menstruaaltsükkel tervikuna on orkestreeritud ovulatoorse tsükli poolt, st menstruaaltsükli perioodilisus sõltub ovulatoorse tsükli perioodilisusest [19, 23].

Tavapäraselt jagatakse menstruaaltsükkel kaheks faasiks – endomeetriumi proliferatiivseks östrogeenide poolt kontrollitavaks faasiks, mis vastab ovariaaltsükli follikulaarfaasile ja

sekretoorseks progesterooni poolt kontrollitavaks faasiks, mis vastab luteaalfaasile (Skeem 2). Tõusev östrogeenide tase follikulaarfaasi ajal stimuleerib endomeetriumi ja säilunud näärpõhjade epiteelirakkude proliferatsiooni, aga ka progesterooni retseptorite sünteesi endomeetriumi rakkudel [22]. Ovulatsiooni järgselt moodustuv kollaskeha produtseerib progesterooni, mille toime endomeetrium edeneb järgmisse, sekretoorsesse faasi (Skeem 2). Progesteroon valmistab endomeetriumi ette blastotsüsti implantatsiooniks, stimuleerides näärmete sekretsiooni, endomeetriumi stroomarakkude suurenemist, spiraalarterite kasvu ning küpsemist. Endomeetrium muutub tervikuna paksemaks ja näärmed keerduvad tugevalt väänilisteks. Jätkuv progesterooni ja östrogeenide toime põhjustab stroomarakkude muutumist suurteks, glükogeenirikasteks detsiduaalrakkudeks, mida stimuleerib blastotsüsti implantatsioon.

Kollaskeha toodab aktiivselt hormone umbes 10 päeva (kui viljastumist ei ole toimunud), misjärel hormoonide tase järsult langeb. Vähenenud hormoonide tase põhjustab muutusi funktsionaalse kihi verevarustuses. Spiraalarterite perioodilised kontraktsioonid tekitavad funktsionaalse kihi isheemia, näärmed lakkavad sekreteerimast ja endomeetrium õheneb. Umbes kahe päeva pärast alates spiraalarterite kontraktsioonidest hakkab epiteelkate katkema ja veresooned rebenema. Seejärel irdub juba kogu endomeetriumi funktsionaalkiht [12, 24].



Skeem 2. Menstruaaltsükli faasid ja hormonaalne regulatsioon. Menstruatsiooni algamist loetakse tavapäraselt menstruaaltsükli alguseks. Follikulaarfaasi iseloomustab dominantse folliikuli selektsioon ja arenemine kuni Graafi folliikuli staadiumini, tõusev östrogeenide ja madal progesterooni tase. Ovulatsiooni aeg on tähistatud katkendliku vertikaaljoonega. Folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) ja luteiniseeriva hormooni (LH) taseme järsk tõus toimub umbes 36 tundi enne ovulatsiooni. Luteaalfaasi iseloomustab kollaskeha moodustumine, küpsemine ja taandarenemine, samuti kõrge progesterooni tase ning jätkuv östrogeenide süntees. FSH tase, mis luteaalfaasi lõpus hakkab kõrgenema on ilmselt seotud uute folliikulite arenguga, mis toimub juba järgmise tsükli follikulaarfaasis [19].

### 3.7. Kollaskeha

Ovulatsioonil lõhkenud munasarja folliikuli granuloosa ja siseteeka rakkudest moodustub kollaskeha (*corpus luteum*). Esmaselt tingib folliikuli lõhkemine veritsemise siseteeka kapillaaridest ja verehüübe moodustumise folliikuli valendikku (kujuneb *corpus hemorrhagicum*). Järgnevalt vereklomp asendub sissetungiva sidekoega, mis moodustab kujunevale kollakehale südamiku. Luteiniseeriv hormoon (LH) mõjutab granuloosa ja

siseteeka rakke ja põhjustab folliikuli allesjäänud osade muutumist ajutiseks endokriinseks näärmeks (luteiniseerumine). Granuloosarakud suurenevad, nende lipiidide sisaldus kasvab ja nad hakkavad sekreteerima progesterooni; osa siseteeka rakke akumulerevad lipiide ja jätkavad östrogeenide produktsiooni. Vastavalt moodustub kaks rakkude populatsiooni, naiste kollaskehas eristatakse suuri granuloosa luteiinrakke (umbes 30 µm läbimõõdus) ja väiksemaid teeka luteiinrakke (ligikaudse läbimõõduga 15 µm). Kollaskeha moodustumisele on iseloomulik kiire veresoonte sissekasvamine siseteekast granuloosa kihti ning endokriinorganitele tüüpilise tiheda kapillaaridevõrgustiku kiire kujunemine.

Kollaskeha saavutab maksimaalse suuruse 20. menstruaaltsükli päevaks. Seejärel kui ei ole toimunud viljastumist algab involutsioon – luteolüüs. Kollaskeha muutub valkjaskkehaks (*corpus albicans*). Kollaskehast jääb järele suhteliselt väike atsellulaarne kollageenkiududega moodustis, mis vähehaaval väheneb [19].

### 3.8. Pinopoodid

Implantatsiooni faasis tekivad luminaarse epiteeli rakkude apikaalse membraani väljasopistised e. pinopoodid [25]. Apikaalse membraani väljasopistused tõmbavad endasse endotsütoosi teel emakasisest vedelikku ja makromolekule, mistõttu emakaõõne maht väheneb ja seinad lähenevad hõljuvale embrüoblastile. Oma pinotsütootilise funktsiooni järgi kutsutaksegi neid spetsiifilisi väljasopistusi pinopoodideks, termin tuleneb kreekakeelsetest sõnadest „*pino podi*“, mis tõlgituna tähendab „joov jalg“ („drinking foot“ ingl.k.) [26; 27; 28]. Siinkohal peab ära märkima, et paralleelseks terminiks nende struktuuride tähistamiseks on uterodoom, sest inglise keeles on terminitel pinopoodid kaks kirja pilti – *pinopods* ja *pinopodes*. Seejuures esimest terminit kasutatakse näriliste ja viimast terminit inimese pinopoodide kirjeldamiseks, uterodoom oleks aga universaalne termin mõlema juhu jaoks [28]. Samuti leitakse uterodoom olevat korrektsemaks terminiks inimesel, sest erinevalt näriliste pinotsütootilistele pinopoodidele inimese analoogsed struktuurid pigem osalevad eksotsütoosis [28; 29].

Arvatakse, et pinopoodid mängivad tähtsat rolli emaka sobiva keskkonna loomisel, aktiivselt absorbeerides materjali läbi emaka valendiku [30; 31; 14]. Nende tähtsus endomeetriumi retseptiivsuses pole täpselt tõestatud, kuid pinopoodide tihedus luminaalse epiteeli rakkude apikaalsel membraanil korreleerub IVF-embrüo siirdamise rasedustulemustega [27]. Pinopode on tuvastatud tavaliselt ultrastruktuuride uurimisel, eeskätt skaneerival elektronmikroskoopilisel uuringul. Endomeetriumi epiteelirakkude apikaalse pinna

struktuurid ehk pinopoodid meenutavad kujult seenekübarat või õhupalli, nende diameeter inimesel on 2 µm [32].

Pinopoodid sisaldavad suurel arvul organelle, nende hulgas mitokondreid, Golgi kompleksi, sekretoorseid põiekesi, agranulaarset endoplasmaatilist võrgustikku ning neis puuduvad suured vakuoolid. Viimased on tüüpilised näriliste pinopoodidele. Siinjuures peab mainima, et rottide pinopoodide ultrastruktuur on inimesega võrreldes oluliselt erinev. Kui inimese pinopoodid lähtuvad kogu epiteeliraku pinnalt, siis rottidel ühenduvad pinopoodid epiteelirakuga ühendusjalakese abil ning sisaldavad üht või kaht suurt vakuooli, rakuorganellid aga puuduvad [28].

Arenevatel pinopoodidel on lühikesed mikrohatud ja nende apikaalne pind on kumer. Täiskasvanud pinopoodide kumeral apikaalsel pinnal mikrohatud puuduvad. Taandarenevatel pinopoodidel on apikaalne pind vähesel määral kumer ja kortsuline, apikaalsel pinnal esinevad ka lühikesed mikrohatud [33; 31; 16]. Paralleelselt SEM meetodiga on pinopoodide esinemist võimalik tuvastada ka valgusmikroskoopilistel uuringutel [34], uurides tugeval suurendusel endomeetriumi katteepiteeli rakkude apikaalset pinda. Pinopoodide eluea kohta käivate uuringute tulemused on väga erinevad. Skaneeriva elektronmikroskoobiga on näidatud pinopoodide esinemist 20.-22. tsükli päeval [34]. Naistel võib pinopoodide esinemise aeg aga varieeruda ka kuni 5 päeva (seda nii loomuliku kui HRT tsükliga naistel) [27]. Pinopoodide teket stimuleerib progesteron, pärsib aga östrogeen ja nad püsivad ainult 2-3 päeva [35; 36]. Samas on mõne autori poolt [28] seatud kahtluse alla pinopoodide oluline roll implantatsioonis, kuna nende struktuuride eluiga nende autorite järgi on väga lühike, kõigest 0,5 päeva. Mõned uuringud [37; 34; 33; 16] on näidanud, et pinopoodide eluiga on vähem kui 48 tundi, luteaalfaasi keskel, teised uuringud on näidanud, et pinopoodid on olemas pärast ovulatsiooni ja säilivad luteaalfaasi lõpuni [38]. Seejuures on oluline märkida, et täpne pinopoodide funktsioon on senini teadmata [28].

Mitmed molekulaarsed markerid korreleeruvad pinopoodide esinemisega endomeetriumis, sealhulgas ka integriin  $\alpha_v\beta_3$  [39]. Nardo kaasautoritega [40] on oma uuringus tuvastanud tugeva seose immunohistokeemiliselt intensiivse integriin  $\alpha_v\beta_3$  värvingu ja pinopoodide formeerumise vahel, kuid teised autorid pole selliseid markerite vahelisi seoseid täheldanud [41].

### **3.9. Mutsiinid**

Mutsiinid (MUC) on sekretoorsete valkude (osalevad epiteelkudesid kaitsva lima tekitamisel) perekonda kuuluvad rakupinna glükoproteiinid, moodustades raku pinda kaitsva



glükokaalüksi ja olles lima peamiseks koostisosaks [23]. Emaka limaskestas esineb peamiselt MUC1, samuti MUC4, MUC6 ja MUC16 [42].

### 3.9.1. MUC1 ja MUC16

MUC1 on rakupinna ja endomeetriumi epiteelirakkude membraani proteiin, mis ekspresseerub apikaalselt. Immunohistokeemilistes uuringutes on määratud mutsiinide asukohta proliferatiivsete näärmete rakkude pinnal. Kolm-neli päeva pärast luteiniseeriva hormooni kõrgtaset ja jätkuva hilise sekretoorse faasi ajal väljuvad sekretoorsed MUC1 emakanäärme valendikku [43]. On kirjeldatud, et MUC1 valku ei seostata pinopoodidega, st. neid ei ekspresseerita pinopoodidega samal ajaperioodil. Samuti on näidatud, et embrüo implantatsiooni ebaõnnestumine on seotud muutunud endomeetriumi MUC1 ekspressiooniga [44; 6; 23]. MUC1 loetakse koguni WOI defineerivaks molekuliks [23].

Implantatsiooniks on vajalikud erinevad hormoonid (östrogeen, progesteron) ja embrüo produtseeritavad signaalid ning muutused nende ekspressioonis häirivad embrüo kinnitumist. On tõestatud, et tõusnud MUC1 ekspressioon sekretoorses faasis on seotud kõrge progesterooni tasemega. Embrüo poolt kontrollitud endomeetriumi retseptiivsus tagatakse MUC1 ekspressiooniga, mis omakorda saavutatakse üle interleukiin-1 süsteemi [44]. Kuigi MUC1 ekspressioon inimese endomeetriumi epiteelil on maksimaalne retseptiivsel perioodil, siis selleks, et implantatsioon saaks toimuda peab MUC1 valgu ekspressioon ära kaduma implantatsiooni kohal [45]. Mitmetel teistel loomaliikidel (hiir, siga, lammas) väheneb adhesioonibarjääri moodustava MUC1 ekspressioon retseptiivses faasis kogu endomeetriumi apikaalsel epiteelil, mitte ainult implantatsiooni kohal [46].

Lisaks MUC1-le on leitud, et ka üks teine membraan-seotud mutsiin, MUC16, varasemalt tuntud kui munasarjavähi marker CA125 [47], on ekspresseeritud normaalsel emakaepiteelil ja ka emaka adenokartsinoomis. Võrreldes MUC1-ga on MUC16-l suurem glükoliseeritud ekstratsellulaarne osa. Nagu MUC1 on ka MUC16 ektodomeen suunatud eemale raku pinnalt ja kuna see on ka osa glükokaalüksist võib MUC16 osaleda rakkude adhesioonibarjääri moodustamisel [23]. Uuringus MUC16 jaotumise kohta emaka epiteelis eelretseptiivses ja retseptiivfaasis [47] määrati immunohistokeemiliselt võrdlevalt MUC16 ja MUC1 kõigis tsükli faasides võetud biopsiates ning leiti MUC16 vähenenud ekspressiooni emaka epiteelil retseptiivses faasis. Uuringus hinnati lisaks trofoblasti adhesioonivõimet kasutades MUC16 ja MUC1 geenipuudulikkuse mudelit. Andmed antud uuringust näitavad membraan-seotud mutsiini, MUC16, ärakadumist pinopoodide pinnalt tsükli retseptiivses faasis. Antud andmed koos *in vitro* uuringutega, mis näitasid trofoblasti rakkude vähenenud adhesioonivõimet ECC-1 rakkudele seoses kõrgema MUC16 ekspressiooniga, viitavad MUC16 rollile endomeetriumi

epiteeli pinnabarjääris, mis tõkestab rakkude seostumist mitteretseptiivsele emakale. Sel viisil võib MUC16 elimineerimine pinopoodidelt võimaldada implantatsiooni. Uuringu andmed näitavad membraan-seotud mutsiini MUC1 ära kadumist mõnedest epiteeli biopsiatest, nagu on kirjeldanud ka teised autorid [44], aga mõnel juhul ka retensiooni osadel retseptiivse faasi pinopoodidel ja ripsepiteeli rakkudel. MUC16 ära kadumine tundub olema ulatuslikum kui MUC1 puhul. Ka näitavad *in vitro* meetodid, et MUC1 ekspressiooni vähendamine siRNA abil ei oma mingit mõju trofoblasti adhesioonile, mis viitab MUC16 suuremale rollile implantatsioonivastases barjääris. Kokkuvõtteks näitavad uuringud, et MUC16 soodustab blastotsüsti adhesioonibariääri teket ning MUC16 ära kadumine uterodoomilt hõlbustab haakuvust emakaepiteelile [48].

### 3.10. Trofiniin

Trofiniin on membraanivalk, mis vahendab rakkude adhesiooni. Trofiniin ekspresseerub inimesel platsenta formeerumisel nii trofoblastis kui ka implantatsioonikohas emaka endomeetriumi epiteelis. Seejuures trofiniin ja temaga seotud valgud tastiin ja bütsiin ekspresseeruvad inimplatsental raseduse varajasel etapil ja neid molekule võib platsentast leida vaid raseduse esimese trimestri algstaadiumis. Samas esineb trofiniini tähtsuses implantatsioonil liigspetsiifilisi erinevusi. Trofiniin ei oma ilmselt otsustavat rolli hiire embrüo implantatsioonil, sest trofiniini geenipuudulikkusega hiired on paljunemisvõimelised [49].

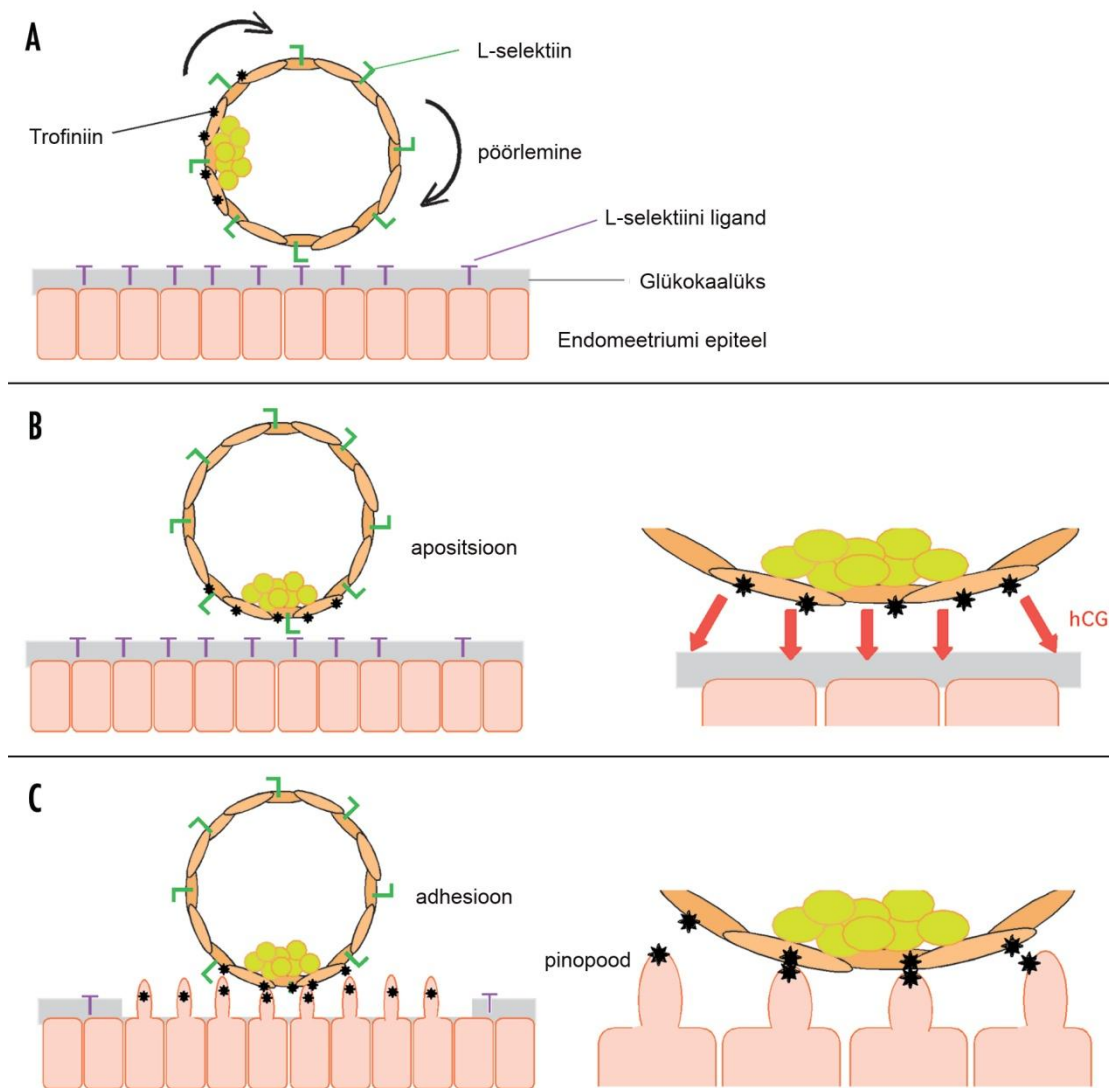
Trofiniin, tastiin ja bütsiin moodustavad unikaalse kompleksi rakkudevahelise ühenduse loomiseks trofoblasti ja endomeetriumi epiteelrakkude apikaalsete osade vahel. Trofiniini on leitud süntsüüsiotrofoblasti rakkude tsütoplasmast koorionihattudes ja endomeetriumi platsentapoolsetest detsiduaalrakkudest [50]. Trofiniin vahendab süntsüüsiotrofoblasti rakkude adhesiooni apikaalsetele plasmamembraanidele. Trofiniin ei ole tüüpiline membraanivalk, tema N-terminaalne osa koosneb u.  $70 \times 10^6$  aminohappest, on hüdrofiilne ja arvatavalt on see regioon tsütoplasmasisene. Sellest johtuvalt tunnevad antud piirkonna spetsiifilised antikehad trofiniini molekuli rakus vaid juhul, kui rakud on permeabiliseeritud. Ülejäänud osa trofiniini molekulist kaasa arvatud C-terminaalne osa koosneb dekapeptiidsetest kordustest. Nendest kordustest kolm on suhteliselt hüdrofoobsed, mis viitab, et tegu on tõelise membraanivalguga. Korduste seas on ka kolm suhteliselt hüdrofiilset regiooni, mis tõenäoliselt ekspresseeruvad raku pinnal.

Trofoblasti pesastumise protsess on normaalse raseduse puhul tugevalt reguleeritud ja kontrollitud. Sellest hoolimata omab trofoblasti pesastumine sarnaseid jooni pahaloomuliste

tuumorite metastaseerumisega, kuna mõlema protsessiga kaasneb kiire rakkude proliferatsioon, peremeesrakkude häving ja angiogenees [51].

Trofiniin on molekul, mida seostatakse inimembrüo pesastumisega ning tema rolli väljaselgitamine annaks meile parema ettekujutuse mõistmaks platsentaarseid protsesse. Inimese endomeetriumis on trofinaini ekspressioon tugeva kontrolli all: trofinain on ekspresseeritud vaid lühikese aja vältel (WOI ajal) endomeetriumi emakaõõne poolse epiteeli apikaalse osa piiratud alal. Platsentaarse arengu esimestes etappides on trofinain, bütsiin ja tastiin tugevalt ekspresseeritud koorionihattudel ja endomeetriumi näärmelisel epiteelil, eriti emaka-platsenta üleminekutsoonis. Emakavälistel rasedustel (inimestele ainuomane nähtus) ekspresseeritakse trofinaini nii trofoblastis kui ka ema munajuha epiteelis ning hCG potenseerib trofinaini ekspressiooni munajuha epiteelirakkudel [50]. Tulemused viitavad, et trofinain ja hCG mängivad koos tähtsat rolli inimembrüo implantatsioonil ja ka ektoopiliste raseduste patogeneesis.

On tõestatud, et hCG-st sõltub munajuhade epiteelirakkude trofinaini tase. Seetõttu on tõenäoline, et blastotsüst sekreteerib hCG-d nii enne implantatsiooni kui ka implanteerumise ajal. Arvestades, et trofinain vahendab rakkude adhesiooni võib eeldada, et blastotsüsti poolt sekreteeritud hCG- $\beta$  põhjustab trofinaini ekspressiooni tõusu emaka epiteelis käivitades trofinain-vahendatud sidumise embrüo ja emaka epiteeli vahel. Embrüo poolt sekreteeritud hCG hulka ja selle ajastust peetakse võtmeteguriteks determineerimaks raseduse edukust või edutust [50]. Trofinaini tähtsust inimese blastotsüsti implanteerumisel endomeetriumi suhtes on kokkuvõtlikult kirjeldatud allpooltoodud joonisel (Skeem 3).



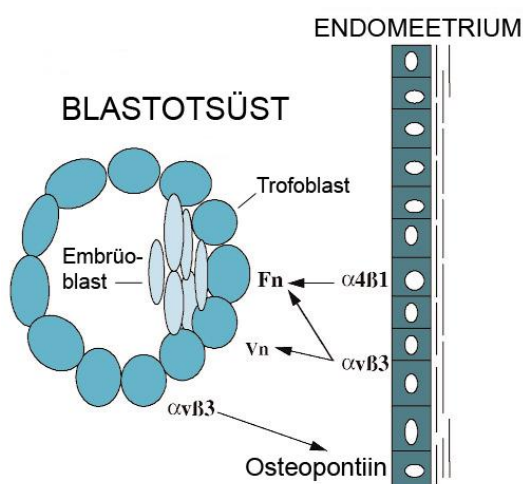
**Skeem 3.** Inimese blastotsüsti emaka endomeetriumi implanteerumise esimesed etapid. (A) Emakaõõnde siseneva blastotsüsti adhesioon endomeetriumi vältitakse paksu glükokaalüksi kihi poolt välja arvatud epiteeli alad, mis ekspresseerivad L-selektiini ligandi (T). Inimese blastotsüst ekspresseerib L-selektiini (L) ja „pöörleb“ L-selektiini ekspresseerival endomeetriumi (B). Selle interaktsiooni ajal hCG, mida blastotsüst sekreteerib toimib lokaalselt indutseerides trofiniini ekspressiooni endomeetriumi epiteelirakkudel (C). Trofiniini ekspresseerivad rakud moodustavad pinopoodide, mis ulatuvad üle glükokaalüksi kihi võimaldades trofoblasti ja pinopoodide kontakti. Seejärel trofoblasti rakud ja pinopoodid sidustuvad tugevalt trofiniin-trofiniin seostumisega (modifitseeritud Fukuda *et al* 2008 järgi [52]).

### 3.11. Integriin $\beta_3$

Integriinid moodustavad rakkude pinnaproteiinide klassi, mis vahendavad rakkude jaoks olulist adhesiooni [53; 54]. Integriinid, heterodimeersed transmembraansed ekstratsellulaarse matriksi retseptorid on olulised embrüo implantatsiooni adhesiooni etapis. Integriinid funktsioneerivad retseptorina ekstratsellulaarse matriksi molekulide ja raku adhesioonimolekulide vahel [54]. Teadaolevalt esineb inimese endomeetriumis üheksa

erinevat  $\alpha$  ja  $\beta$  integriinide alaühikut, mis omavahel kombineerudes võivad epiteelis osaleda erinevate funktsioonide täitmisel [55]. Implantatsiooni aknas (WOI) on näidatud integriinide  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$  ja  $\alpha_v\beta_3$  esinemist [56]. Viimast neist ekspresseeritakse luminaalse epiteeli apikaalsel pinnal ja arvatavasti on ta ankruks trofoblasti rakkudele adhesiooni faasis. Oluliselt suureneb WOI faasis  $\alpha_v\beta_3$  integriini ekspressioon [55]. Lisaks endomeetriumi rakkudele ekspresseerivad integriini molekule ka trofoblasti rakud [57]. Seetõttu võivad adhesioonis osaleda samale ekstratsellulaarse maatriksi komponendile seostuvad trofoblasti ja endomeetriumi epiteelirakkude integriinid. Nagu on näidatud skeemil 4- endomeetriumi integriin  $\alpha_v\beta_3$  interakteerub trofoblasti poolt ekspresseeritud vitronektiini ja fibronektiiniga, samas trofoblasti integriin  $\alpha_v\beta_3$  seostub endomeetriumi poolt ekspresseeritud osteopontiiniga [58].

Uuringutega on näidatud, et integriin  $\beta_3$  esineb nii munajuha epiteelis kui ka endomeetriumi epiteelis, mille ülesreguleerimine toimub endomeetriumi retseptiivsuse perioodis. Kuna munajuha ja endomeetriumi  $\beta_3$  integriini alaühik on ilmselt sama süsteemsete signaalide kontrolli all, esineb WOI samal ajal mõlemas kohas. See aga võimaldab 5-7 päevasel trofoblastil peetuda munajuhas ja põhjustada emakavälist rasedust. Integriinide ekspressiooni muster inimese endomeetriumis muutub pidevalt menstruaaltsükli jooksul. Luteaalfaasi keskel ekspresseerub integriini alaühik  $\beta_3$  nii näärmete kui ka endomeetriumi epiteelirakkudel. Integriin  $\beta_3$  alaühiku vähesus võib olla üks viljatuse põhjustest, sest näiteks paljudel hüdroalpinksiga naistel on tõestatud  $\alpha_v\beta_3$  integriini ekspressiooni vähesust võrreldes tervete naistega [59; 60]. Integriin  $\beta_3$  ekspressiooni häireid on leitud naisepoolse infertiilsuse ja luteaalfaasi häirete korral [61; 55].



**Skeem 4.** Integriinide osalus trofoblasti ja endomeetriumi interaktsioonis. Fn – fibronektiin; Vn – vitronektiin (modifitseeritud Mariviel et al 2009 järgi) [58].

#### **4. TÖÖ EESMÄRK**

- 1.** Uurida võrdlevalt alla 34-aastaste ja üle 34-aastaste viljatute naiste, kes on edutult läbinud IVF protseduure, endomeetriumi katteepiteeli ja emakanäärmete epiteeli seisundit kasutades kompleksset morfoloogilist analüüsi.
- 2.** Uurida valgusmikroskoopia meetodiga patsientide endomeetriumi struktuuri ja pinopoodide esinemist ning immunohistokeemiliselt määrata integriin  $\beta_3$ , MUC1, MUC16 ja trofiniini sisaldust patsientide endomeetriumis.
- 3.** Uurida SEM meetodil endomeetriumi epiteelirakke ja pinopoode.

## 5. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 5.1. Materjal ja meetodika

Uurimismaterjaliks olid 10 reproduktiivses eas patsiendi endomeetriumi biopsiad (Nova Vita Kliinik, Tallinn). Endomeetriumi biopsia on rutiinselt näidustatud, kuna patsiendid olid läbinud ühe või enam ebaõnnestunud IVF-protseduuri. Biopsia võeti narkoosis, loomuliku menstruaaltsükli 7.-10. ovulatsioonijärgsel päeval, mis vastas endomeetriumi implantatsiooni faasile ehk 21.-24. tsükli päevale. Endomeetriumi biopsia tehti menstruaaltsükli, mille käigus ei teostatud lastetuse ravi protseduure ning biopsia võttis kõigilt patsientidelt üks günekoloog.

Uuritud patsientide vanus oli 28–40 aastat (patsientide vanuseline jaotumus on toodud tabelis 1). Patsiendid jagati kahte rühma – grupp I, patsiendid vanuses alla 34 aasta (grupi keskmine vanus  $30,0 \pm 0,7$ ) ja grupp II, patsiendid vanuses üle 34 aasta (grupi keskmine vanus  $37,2 \pm 1,0$ ). Endomeetriumi biopsiad võeti informeeritud ja nõusoleku andnud patsientidelt ja uuringuks on olemas Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee luba.

### 5.2. Histoloogia

Operatsiooni käigus uurimiseks võetud endomeetriumi biopsiad fikseeriti koheselt 10% formaliini lahuses (Nova Vita Kliinik, Tallinn). Biopsiate sisestamine toimus automaatsliinil Tissue-Tek<sup>®</sup> VIP<sup>™</sup> 5 Jr (Sakura, USA) ja parafiini sisestusliinil Microm (Saksamaa). Parafiinblokkidest lõigati rotatsioonimikrotoomil Ergostar HM 200 (Microm, Saksamaa) 4- $\mu$ m paksused lõigud, millised kinnitati alusklaasidele. Igast biopsiast valmistati kaks preparaati, kusjuures igale preparaadi alusklaasile asetati 3-4 lõiku. Preparaate kuivatati histoloogilisel kuivatusplaadil 37°C juures üleöö. Ülevaatepreparaatide valmistamiseks värviti lõike H&E klassikalise meetodika järgi. Morfoloogiliselt hindas endomeetriumi katteepiteeli seisundit, näärmete epiteeli, spiraalarterite esinemist, strooma ja näärmete suhet biopsias, pinopoodide esinemist neli sõltumatut uurijat.

### 5.3. Immunohistokeemia (IH)

IH uuringuteks lõigati mikrotoomil Ergostar HM 200 (Microm, Saksamaa) 3- $\mu$ m paksused lõigud ja püüti ühele SuperFrost klaasile kolm lõiku (Menzel-Gläser, Saksamaa), kokku valmistati 48 preparaati. Seejärel kuivatati preparaate histoloogilisel kuivatusplaadil 2 tunni

jooksul temperatuuril 32°C. Immunohistokeemiliselt määrati integriin  $\beta_3$ , MUC1, MUC16, trofoniini sisaldust katteepiteelis ja näärmete epiteelirakkudes.

IH uuringu tegemiseks preparaadid deparafineeriti ja veetustati. Peroksüdaas blokeeriti 0,6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fluka, Prantsusmaa) metanoolis (Merck, Saksamaa). Seejärel pesti lõike destilleeritud vees ja PBS-is (pH=7,4 Gibco, Invitrogen Corporation, USA) 10 minuti jooksul. Järgnevalt töödeldi lõike normaalse 1,5% kitse seerumiga (Gibco, Invitrogen Corporation, USA) 30 minuti jooksul toa temperatuuril ja inkubeeriti seejärel primaarse antikehaga: integriin  $\beta_3$  (lahjendus 1:250, Dako, Taani), MUC1 (lahjendus 1:50, AbD Serotec, Inglismaa); MUC16 (lahjendus 1:100, AbD Serotec, Inglismaa), trofoniin (lahjendus 1:500, Abcam, Inglismaa) üleöö temperatuuril 4°C niiskes kambri. Järgmisel päeval pesti lõike PBS-is ja inkubeeriti universaalse sekundaarse antikehaga (VECTASTAIN ABC Universal Kit, Burlingame, USA) 30 minutit toa temperatuuril. Lõike pesti PBS-is ja inkubeeriti 30 minuti jooksul VECTASTAIN ABC reagentiga (VECTASTAIN, ImmunoVision Technologies, Co, USA). Seejärel pesti lõike PBS-is ja töödeldi reaktsiooni visualiseerimiseks DAB-iga (Vector, USA) 10 minuti jooksul toa temperatuuril. Lõike pesti PBS puhvril, järelvärviti hematoksyliiniga või hemalauniga, veetustati ning sulundati Eukitt'iga (Fluka, Šveits). Immunohistokeemilist tulemust hinnati skaalaga 0 kuni 4 (0 – reaktsioon puudub, 1 – minimaalne reaktsioon, 2 – nõrk reaktsioon, 3 – mõõdukas reaktsioon, 4 – tugev reaktsioon). Immunohistokeemilise uuringu negatiivne kontroll tehti primaarse antikehata. Tulemusi interpreteerisid kolm sõltumatut uurijat.

#### **5.4. Skaneeriv elektronmikroskoopia**

Skaneeriva elektronmikroskoopilise uuringu jaoks võetud koeproovid (20 tk) fikseeriti kahe tunni jooksul 2,5% glutaaraldehüüdi (Merck, Saksamaa) lahuses Na-kakodülaatpuhvril (pH=7,4). Seejärel veetustati proove tõusva kontsentratsiooniga etanoolide reas (50°→100°). Proove kuivatati EMÜ Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituudi morfoloogia osakonnas spetsiaalses kriitilise punkti kuivatusseadmes. Pärast kuivatamist kinnitati proovid alumiiniumalustele ning kaeti katmiskambri kullaga. Proove uuriti ning pildistati EMÜ-s skaneerivas elektronmikroskoobis SEM LEO-1430 VPSE.

#### **5.5. Östradioli ja progesterooni määramine**

Östradioli ja progesterooni sisaldus patsientide vereseerumis määrati SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlaboratooriumis.



## **5.6. Statistiline analüüs**

Kahe vanuserühma (grupp I vs grupp II) tulemuste võrdlemisel kasutati Student  $t$ -testi või Mann-Whitney U-testi (immunohistokeemiliste tulemuste hindamisel).

## **5.7. Magistrandi osalus**

Kraaditaotleja osales magistriprojekti kõikides etappides – valmistas histoloogilised preparaadid, teostas kõik immunohistokeemilised reaktsioonid ning oli üks nii histoloogiliste kui immunohistokeemiliste preparaatide hindajatest ja analüüsijatest. Samuti osales kraaditaotleja SEM uuringute teostamisel ning hindas SEM preparaate.

## 6. TULEMUSED

### 6.1. Endomeetriumi paksus

Ultraheliuuringul määratud endomeetriumi paksus patsientidel oli varieeruv (Tabel 1) ja kahe grupi (alla ja üle 34-aastaste patsientide rühmad) osas erinevusi ei ilmnenu.

### 6.2. Histoloogia

Emaka endomeetriumi pinda katvad ühekihilise prismaatilise epiteeli rakud olid normis 8 patsiendil (Joonis 2), kahel patsiendil (patsiendid nr 1 ja 10) oli kahjustunud epiteelirakkude apikaalne osa. Olenevalt tsükli faasist olid viie patsiendi endomeetriumi biopsiates nähtavad spiraalarterid (Joonis 1). Endomeetriumi näärmete küpsusaste oli neljal patsiendil väiksem ja ei langenud morfoloogiliselt kokku nende patsientide poolt öeldud tsüklipäevaga. Ühe patsiendi (patsient nr 2) biopsias sisaldasid näärmerakkude basaalsed osad glükogeeni, mis on iseloomulik sekretsioonifaasi algusele. Ka see tulemus ei langenud kokku patsiendi poolt öeldud tsüklipäevaga. Sidekoeline strooma oli preparaatides reeglina rakurohke ja sisaldas fibroblaste, makrofaage, koebasofiile ning väiksemal määral lümfotsüüte ja neutrofiilseid granulotsüüte. Näärmete ja strooma vahekord oli uuritud preparaatides erinev (Tabel 1). Valgusmikroskoopilisel uuringul olid kahe patsiendi biopsias epiteelirakkude apikaalsel pinnal nähtavad pinopoodid (Joonis 3). Kokkuvõttes võib öelda, et histoloogilise uuringu põhjal võisime järeldada viiel patsiendil menstruaaltsükli faasi hilinemist, kahel patsiendil alla 34. aastate rühmas (Grupp I) ja kolmel patsiendil üle 34. aastaste rühmas (Grupp II, tabel 1).

**Tabel 1.** Patsientide vanuseline jaotumus (grupp I alla 34. a ja grupp II üle 34. a.), endomeetriumi ultraheliuuringus määratud paksuse ja valgusmikroskoopiliste uuringute tulemused.

	Nr	Patsiendi vanus	Endomeetriumi paksus mm	Tsükli päev	Faasi maha-jäämus	Näärmete : strooma suhe	Spiraalarterid	Pinopoodid
Grupp I	2	29	9.0	21	+	1:2	-	-
	4	32	12.8	24	-	1:1	+	+
	5	31	11.6	24	-	1:1	+	-
	6	30	11.5	26	-	2:1	+	-
	7	28	7.9	21	+	1:1	-	-
<b>x±SEM</b>		<b>30,0±0,7</b>	<b>10,6±0,1</b>					
Grupp II	1	36	6.9	22	+	1:1	alged	-
	3	38	16.4	25	+	1:1	+	+
	8	40	8.3	25	-	2:1	-	-
	9	38	10.4	23	-	1:2	+	-
	10	34	-	32	+	1:2	-	-
<b>x±SEM</b>		<b>37,2±1,0</b>	<b>10,5±2,1</b>					

### 6.3. Immunohistokeemia

Immunohistokeemiliste meetoditega uuriti mutsiinide MUC1 ja MUC16 ekspressiooni endomeetriumi epiteelirakkudes, eraldi katteepiteelis ja emakanäärmete epiteelis. MUC1 on tuvastatud nii endomeetriumi katteepiteeli (Joonised 10, 11) kui ka emakanäärmete epiteelirakkude apikaalsel pinnal (Joonis 12) kõikides uuritud biopsiates. MUC16 ekspressioon oli nõrgem 2. grupis üle 34. aastastel patsientidel ( $P < 0,05$  grupp I vs grupp II), kus nelja patsiendi biopsiates MUC16 ei tuvastatud (Tabel 2, joonis 15). Ainult ühel patsiendil (Tabel 2, nr 7) tuvastati väga tugev MUC16 ekspressiooni. Trofiniini tulemused olid positiivsed kuuel patsiendil, neist neljal oli ekspressioon minimaalne (Tabel 2, joonis 13). Teise grupi üle 34. aastastel patsientidel oli trofiniini tase mõnevõrra madalam kui noorematel patsientidel, kuid see erinevus ei olnud statistiliselt tõepärane. Integriin  $\beta_3$  ekspressioon oli tugev ühe esimese grupi patsiendi emakanäärmete epiteelis (Tabel 2, nr 7; joonis 14), teistel selle grupi patsientidel kõikusid näitajad endomeetriumi katte- ja näärmeepiteelis nõrgast reaktsioonist tugeva reaktsioonini (Tabel 2), kuid üle 34-aastaste patsientide rühmas (Grupp II) oli integriini tase oluliselt madalam võrreldes nooremate patsientidega.

Tabel 2. Immunohistokeemiliste uuringute tulemused.

	Nr	MUC1		MUC16		Integriin $\beta_3$		Trofiniin	
		EK	EN	EK	EN	EK	EN	EK	EN
Grupp I	2	4	4	1	1	1	2	2	1
	4	2	2	2	2	2	1	0	0
	5	3	3	1	1	1	1	1	0
	6	3	2	1	0	2	3	0	0
	7	2	2	4	4	2	4	2	1
<b>x±SEM</b>		<b>2,8±0,4</b>	<b>2,6±0,4</b>	<b>1,8±0,6</b>	<b>1,6±0,7</b>	<b>1,6±0,3</b>	<b>2,2±0,6</b>	<b>1±0,5</b>	<b>0,4±0,3</b>
Grupp II	1	3	3	1	1	0	1	1	0
	3	2	2	0	0	1	0	0	0
	8	3	3	0	0	1	1	0	0
	9	3	3	0	0	0	0	1	0
	10	3	3	0	0	0	0	1	0
<b>x±SEM</b>		<b>2,8±0,2</b>	<b>2,8±0,2</b>	<b>0,2±0,2*</b>	<b>0,2±0,2</b>	<b>0,4±0,3*</b>	<b>0,4±0,3*</b>	<b>0,6±0,3</b>	<b>0</b>

EK – Endomeetriumi katteepiteel; EN – Emakanäärmete epiteel

0 – reaktsiooni puudumine;

1 – minimaalne reaktsioon;

2 – nõrk reaktsioon;

3 – mõõdukas reaktsioon;

4 – tugev reaktsioon

\*  $P < 0,05$  grupp I vs grupp II

#### 6.4. Skaneeriv elektronmikroskoopia

SEM meetodil uurisime emakanäärmete (Joonised 4, 5) epiteelirakke. Seitsme patsiendi proovides (Grupp I – nr 2, 4, 6, 7; Grupp II – nr 1, 3, 9) olid korrapärased ühekihilise prismaatilise epiteeli rakud (Joonised 6, 7, 9). Sekretoorsed rakud olid korrapärase kujuga, rakud sisaldasid korrapäraseid, lühikesi tihedalt paiknevaid mikrohatte. Kolme patsiendi (Grupp I – nr 5; Grupp II – nr 8, 10) sekretoorsetel epiteelirakkudel olid vähesel hulgal või puudusid mikrohatud, mistõttu rakud olid „paljad” (Joonis 8). Seitsme patsiendi biopsia (Grupp I – nr 2, 4, 6, 7; Grupp II – nr 1, 3, 9) uurimisel olid ripsrakkude apikaalsel pinnal pikad, korrapärased ripsmed ja mikrohatud. Kahel Grupp I ja kolmel Grupp II patsiendil tuvastati SEM uuringul pinopoodid (Tabel 3). Ühes ja samas biopsias võis näha nii suuri, korrapäraselt arenenud pinopoode, kui ka kokkutõmbunud, sissevajutatud pealmise pinnaga taandarenevaid pinopoode (Joonis 6). Pinopoodide hulk biopsiates oli erinev. SEM uuringul loendati suurendusel 4050x biopsia preparaadi viies vaateväljas ripsrakkude ja sekretoorsete rakkude arv ning arutati nende rakkude protsentuaalne vahekord. Mõlemas grupis oli sekretoorsete rakkude osakaal suurem ja mõlemas grupis oli ühel patsiendil (nr 2 ja nr 9) rips- ja sekretoorsete rakkude vahekord suhteliselt võrdne (tabel 3). Lisaks määrati epiteelirakkudel pinopoodide arv ja tüüp. Esimeses grupis võis leida pinopoode kahel patsiendil, kusjuures ühel neist (nr 4) oli tegemist taandarnevate pinopoodidega. Teises grupis olid pinopoodid nähtavad kolmel patsiendil ja ühel neist (nr 9) olid osad pinopoodidest taandarenevad (Tabel 3).

Tabel 3. SEM uuringute tulemused.

	Nr	Ripsmetega rakud (%)	Sekretoorsed rakud (%)	Pinopoodide arv	Pinopoodide tüüp
Grupp I	2	47,1	52,9	0	0
	4	8,0	92,0	14	R
	5	19,3	80,7	0	0
	6	30,7	69,3	8	F
	7	24,8	75,2	0	0
x±SEM		<b>26,0±6,5</b>	<b>74,0±6,5</b>	<b>4,4±2,9</b>	
Grupp II	3	28,1	71,9	24	F
	1	35,1	64,9	0	0
	8	12,9	87,1	18	F
	9	49,4	50,6	24	14F/10R
	10	23,1	76,9	0	0
x±SEM		<b>29,7±6,1</b>	<b>70,3±6,1</b>	<b>13,2±5,5</b>	

F – arenenud täiskasvanud pinopoodid;

R – taandarenevad pinopoodid

Gruppidevahelised muutused ei ole statistiliselt tõepärased.

## 6.5. Östradioli ja progesterooni seerumitasemed

Vereseerumi hormoonide tase (Tabel 4) oli kõikidel patsientidel normide piires välja arvatud patsient nr 1, kellel progesterooni tase oli väga madal (< 0,64 nmol/L). Patsiendil nr 10 olid nii östradioli (148 pmol/L) kui progesterooni (3,21 nmol/L) sisaldus normi alumisel piiril (normiväärtused vt. tabel 4), kuid siiski nende hormoonide tase oli selgelt madalam kui teistel patsientidel (välja arvatud patsient nr 1 progesterooninäitajad).

Tabel 4. Östradioli ja progesterooni sisaldus patsientide vereseerumis

	Nr	Östradiool pmol/L <i>Luteaalfaasi norm: 101-905*</i>	Progesteroon nmol/L <i>Luteaalfaasi norm: 3,0-67*</i>
Grupp I	2	756	53,7
	4	822	66,5
	5	602	33,4
	6	437	30,2
	7	429	17,8
$\bar{x} \pm \text{SEM}$		<b>609,2±80,3</b>	<b>40,32±8,7</b>
Grupp II	1	727	<0,64**
	3	474	25,8
	8	536	38,2
	9	709	49,3
	10	148	3,21
$\bar{x} \pm \text{SEM}$		<b>518,8±104,7</b>	<b>29,13±9,9</b>

Gruppidevahelised erinevused ei ole statistiliselt tõepärased.

\*Normväärtused näidatud vastavalt Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlabori referentsväärtustele [62].

\*\*Patsient nr 1 progesterooni väärtust ei ole arvestatud teise grupi aritmeetilise keskmise arvutamisel.

## 7. ARUTELU

Teaduskirjanduse andmete põhjal elab maailmas rohkem kui 70 miljonit paari, kellel esineb meditsiiniline probleem laste saamisel ning neist ainult pooled otsivad infertiilsuse probleemile meditsiinilist abi. Naise viljatuse korral on peamisteks põhjusteks muutused funktsioneerivates reproduktiivorganites, mis võivad olla tekkinud nii hormonaalsetest probleemidest kui ka reproduktiivorganite patoloogiast (munajuhade patoloogiad, endometriosis, emaka patoloogiad).

Endomeetriumi retseptiivsuse hindamisel on kliiniliselt kasutatud ultraheli ning histoloogilisi uuringuid. Endomeetriumi ultraheli uuringud on mitte-invasiivsed protseduurid ja neid saab kasutada vahetult IVF-protseduuris. Vastupidiselt ultraheli uuringutele on endomeetriumi biopsia aga invasiivne protseduur ja seda saab teostada ainult IVF-protseduurile eelneva menstruaaltsükli sekretsioonifaasis. Morfoloogilised muutused endomeetriumis on esmakordselt kirjeldatud juba 60 aastat tagasi Noyes`e klassikaliseks saanud publikatsioonis [63].

Endomeetriumi arengu mahajäämus, mida diagnoositakse valgusmikroskoopiliste meetoditega, tekib põhiliselt luteaalfaasi progesterooni sekretsiooni häiretest. Meie uuringus olnud teises vanemaalisemate patsientide grupis oli ühel patsiendil selgelt madal vereseerumi progesteroonitase ja teisel normi alumisel piiril, kuid biopsiate patohistoloogilise uuringu põhjal ilmnis viiel patsiendil endomeetriumis sekretoorse faasi mahajäämus (Tabel 5). Hiljutistes uuringutes on näidatud, et endomeetrium „talub“ ulatuslikke progesterooni seerumitaseme kõikumisi ja progesteroonitase ei peegelda korrektselt endomeetriumi arengut [64; 65]. Samas on näidatud [66], et endomeetriumi sekretoorse faasi mahajäämus esineb ligikaudu pooltel viljakatel naistel, mis vähendab oluliselt histoloogilise uuringu väärtust. Endomeetriumi histoloogilise uuringu olulisus on viimastel aastatel kriitiliselt ümber hinnatud, sest on leitud, et see meetod ei ole piisavalt täpne luteaalfaasi puudulikkuse hindamiseks [67]. Meie arvamuse kohaselt on aga rutiinse endomeetriumi biopsia tähtsus naise infertiilsuse põhjuste diagnostikas vaatamata nendele tulemustele siiski oluline. Histoloogiline uuring oma lihtsusega annab endomeetriumi kohta piisavalt palju olulist ja täpset informatsiooni, mis kiiresti analüüsituna võimaldab arvestada konkreetse patsiendi endomeetriumi seisundit ja lähtuvalt sellest valida edasise ravi/protseduuride taktika. Uuringul peab arvestama, et IVF-protseduuris läbi viidud endomeetriumi biopsia histoloogia ei vasta tihti selle arengule loomulikus menstruaaltsükli. Kirjanduses on esitatud andmeid, et IVF-protseduuris tuvastatakse küllaltki sageli peri-ovulatoorse ja post-ovulatoorse

endomeetriumi kiiremat arengut kui normaalse menstruaaltsükli korral. Sekretoorse faasi alguses täheldatakse aga endomeetriumi normaalhistoloogiat ning selle faasi keskosas ja lõpus näärmete ja strooma arengu erinevusi [68]. Ilmselt infertilsete naiste endomeetriumi uuringuteks on mõistlikuks lähenemisviisiks kompleksne analüüs, kus lisaks tavahistoloogilisele uuringule kaasatakse ka skaneeriv elektronmikroskoopiline ja immunohistokeemiline uurimine. Nii on endomeetriumi retseptiivsuse võrdleval uurimisel fertiilsetel ja infertiilsetel naistel leitud, et hematoksüliin-eosiin värving, skaneeriv ja transmissioon elektronmikroskoopia ja immunohistokeemia eraldiseisvatena ei ole headeks endomeetriumi retseptiivsuse markeriteks [44]. Samamoodi Thomas kaasautoritega [69] on leidnud, et ainult üks immunohistokeemiliselt määratav marker (antud juhul integriin) ei ole piisava kliinilise väärtusega endomeetriumi retseptiivsuse hindamisel.

Meie uuringus kasutati komplekselt nii valgusmikroskoopilist, skaneerivat elektronmikroskoopilist (SEM) kui immunohistokeemilist analüüsi (tabel 5). Uuritavad patsiendid olid jagatud kahte vanuserühma - alla 34 aasta (grupp I) ja vanuses  $\geq 34$  aastat (grupp II). Patsientide vanus mängib küllalt olulist rolli IVF protseduuride edukuses. Nii näiteks Singapuris läbiviidud uuringus leiti, et IVF protseduure läbinud patsientide viljastumise edukus oli 50,9% naistel alla 34 aasta, 49,9% vanuses 35-39 ja 37,9% vanuses üle 40 aasta. Rasestumise edukus oli vastavalt 43,3%, 32,7% ja 14,3% [70]. Sarnaseid vanuselisi muutusi on leitud ka teises uuringus, kus rasestumise edukus langes 48,8%-lt naistel alla 30 eluaasta 13,6%-le naistel üle 42 eluaasta [71] ning uuringus, kus võrreldi IVF protseduure läbinud alla ja üle 35 aasta vanuseid naisi [72]. Selles retrospektiivses uuringus, mis hõlmas 230 patsienti oli rasestumise edukus 35,17% alla 35-aastastel ja 17,93% üle 35-aastastel naistel. Seejuures on leitud, et implantatsiooni vähesem edukus vanematel IVF protseduure läbivatel naistel ilmselt ei sõltu stimulatsiooni ulatusest ja kuigi „ootsüüdi faktor“ on ilmselt olulisim, siis on ka andmeid, et vähenev endomeetriumi retseptiivsus võib siin mängida oma osa [71]. Viimast on näidatud ka värskes uuringus, kus leiti, et endomeetriumi retseptiivsuse marker HOXA10 pöördvõrdeliselt korreleerub vanusega, s.t. et vanuse tõustes endomeetriumi retseptiivsus langeb [73].

Meie SEM uuringutes selgus, et epiteelirakkude üldises kujus olulisi erinevusi ei olnud. Küll aga olid muutused toimunud epiteelirakkude apikaalse pinna kattes, kus olid kahjustatud või puudusid epiteelirakke katvad ripsmed. Ripsmeid kattev membraan oli mõnel juhul (kahe esimese grupi patsiendi biopsiad) elektronihe, mis viitab muutustele membraani moodustavate proteiinide sisalduses. See fenomen vajaks edasist täiendavat uurimist. Endomeetriumi epiteelil on ülioluline roll embrüo pesastumisel ning muutused

epiteelirakkude ripsmete membraanides võivad olla üheks seda protsessi häirivaks faktoriks. Valgusmikroskoopiliselt ja SEM uuringul tuvastati olulisi pinnaepteeli kahjustusi neljal patsiendil – ühel patsiendil esimeses grupis ja kolmel patsiendil teises grupis (Tabel 5). SEM uuringutel ilmsid pinopoodid viie patsiendi epiteelirakkude apikaalsel pinnal (kahel patsiendil 1. grupis ja kolmel patsiendil 2. grupis), valgusmikroskoopilisel uurimisel olid pinopoodid sedastatavad ainult kahel patsiendil (Tabel 5), mis on ka ootuspärane erinevus, sest SEM uuring on rakupinna ultrastruktuuri uuringuteks kindlasti täpsem meetod. Pinopoodide peetakse embrüo implanteerumiseks olulisteks struktuurideks ning nende puudumist tõsiseks häireks endomeetriumi seisundis. Mõnede uurijate arvates võib pinopoodidega arvestada kui endomeetriumi retseptiivsuse kliinilise markeriga [74]. Samas on järjest enam kogunemas andmeid, et pinopoodid võivad esineda inimesel läbi kogu luteaalfaasi ja seega nende esinemine ei pruugi alati langeda kokku kitsa implantatsiooniaknaga (WOI) [75; 38]. Pinopoodide struktuuris ja ilmselt ka tähtsuses on olulisi liigilisi erinevusi. Rottidel peetakse pinopoodide headeks endomeetriumi retseptiivsuse markeriteks, sest nad esinevad ainult implantatsiooni akna (WOI) ajal. Samas hiirtel ja inimesel pinopoodid ei ole nii kasulikud markerid, sest võivad esineda ka väljaspool WOI perioodi [28]. Pinopoodide uuringutel on ka omad tehnilised raskused tingituna endomeetriumi pinna ebatasasusest ja näärmete väänilisest kulust, mistõttu sõltuvalt biopsia võtmiskohast ei pruugi pinopoodid olla alati jälgitavad.

Viimastel dekaadidel on järjest rohkem tähelepanu hakatud pöörama endomeetriumi erinevatele immunohistokeemilistele uuringutele, mis peaksid aitama välja selgitada epiteelirakkudes sisalduvaid implantatsiooniprotsessiks olulisi proteiine ning nende täpsemat rakusisest lokalisatsiooni. Embrüo implantatsiooni [76] algetapis pesastub embrüo trofoblasti abil endomeetriumis ning selle protsessi tulemusena tekivad molekulaarsed sidemed trofoblasti ja epiteelirakkude vahel L-selektiini kaudu. Samuti peetakse implantatsioonil oluliseks molekulaarkompleksi, mis koosneb trofiniinist, tastiinist ja bütsiinist ning mis vahendab apikaalset adhesiooni inimese trofoblasti ja endomeetriumi epiteelirakkude vahel (Skeem 3) [51]. Trofiniin on terviklik membraanivalk, millest osa ekspresseerub rakupinnal. Samas kompleksis asuvad tastiin ja bütsiin on tsütoplasmaatilised valgud, mis reguleerivad trofiniini aktiivsust (mis omakorda reguleerib rakkude adhesiooni aktiivsust). Trofiniini kõrgeenenud ekspressiooni endomeetriumis on leitud luteaalfaasis ja kõrgeimat trofiniini taset on nähtud luteaalfaasi keskel [77]. Meie immunohistokeemilistes uuringutes määratud trofiniini tase oli patsientide biopsiates endomeetriumi katteepiteelirakkudes üldkokkuvõttes madal, eriti 2. grupis (Tabel 5), mis võib olla ka üheks antud patsientide infertiilsust



soodustavaks faktoriks. Madalamat trofiniini ekspressiooni infertilsetel naistel võrreldes fertiilse kontrollrühmaga on leidnud ka Wang kaasautoritega [77]. Samuti ei esinenud meie uuritavate patsientide endomeetriumis trofiniini ekspressiooniga samal ajal pinopoodide, ainult patsiendil nr 9 ilmnis koos pinopoodide olemasoluga ka nõrk trofiniini reaktsioon (Tabel 5). Siinkohal peab mainima, et blastotsüsti poolt produtseeritav hCG arvatakse indutseerivat implantatsiooni kohas lokaalselt trofiniini tugevat ekspressiooni, mistõttu mujal endomeetriumis võib trofiniini tase jääda madalamaks [78].

Blastotsüsti implantatsioonil on olulised ka integriinid, mis funktsioneerivad retseptorina ekstratsellulaarse maatriksi molekulide ja raku adhesioonimolekulide vahel [54]. Luminaalse epiteeli rakud ekspresseerivad mitmeid integriine, kuid on näidatud, et WOI ajal on tõusnud  $\alpha_v\beta_3$  integriini ekspressioon [55] ning lisaks endomeetriumi rakkudele ekspresseeruvad integriinid ka embrüo trofoblastis [57]. Samuti on näidatud, et endomeetriumi  $\alpha_v\beta_3$  integriini ekspressioon korreleerub IVF rasedustulemustega [17]. Seevastu teises uuringus, kus võrdlevalt hinnati integriinide ekspressiooni endomeetriumis fertiilsetel kontrollrühma naistel ja naistel, kes läbisid IVF protseduuri, ei leitud nende kahe rühma vahel erinevusi integriinide ekspressioonis [69]. Samas uuringutes, kus võrreldi  $\beta_3$  integriini ekspressiooni võrdlevalt fertiilsetel ja infertilsetel naistel leiti integriini madalam tase infertilsete naiste endomeetriumi näärmeepiteelis, mitte aga pinnaepiteelis [79; 80]. Meie uuringus oli  $\beta_3$  integriini ekspressioon mõõdukalt väljendunud ainult noorema vanuserühma patsientidel endomeetriumi katte – ja näärmeepiteelis (Grupp I) - ühel patsiendil (nr 7) ilmnis väga tugev reaktsioon ja teisel tugev reaktsioon (nr 6) endomeetriumi näärmeepiteelis (Tabel 2). Vanema rühma patsientidel (grupp II) oli ekspressioon oluliselt nõrgem või puudus sootuks (Tabel 5), mis viitab võimalikule olulisele embrüo implanteerumisega seotud probleemidele nendel patsientidel. Seejuures integriinide taseme langus võib olla seotud ka munajuha patoloogiatega, sest hüdsalpinksi korral on näidatud  $\alpha_v\beta_3$  integriini langust endomeetriumis võrreldes kontrollrühmaga [59]. Integriinide tase seostub meie uuringus teise võimaliku retseptiivsuse markeri pinopoodidega. Kõikidel juhtudel kui leiti pinopoodide tuvastati ka  $\beta_3$  integriini kas mõõdukas reaktsioon (Grupp I) või nõrk reaktsioon (Grupp II; tabel 5).

Endomeetriumi pinnal glükokaalüksi komponentideks olevad mutsiinid MUC1 ja eriti MUC16 osalevad ilmselt adhesioonibarjääri moodustamisel ja edukaks implantatsiooniks on vajalik nende komponentide elimineerimine. Nii on leitud MUC1 suuremat reaktiivsust infertilsete naiste endomeetriumis võrreldes fertiilsete naistega [44], kusjuures MUC1 ei olnud seotud pinopoodidega [44; 81]. Samas on siiski näidatud, et MUC1 on mõnedel juhtudel leitav pinopoodidel kui ka ripsrakkudel retseptiivses perioodis, samas kui MUC16

normaalselt kaob pinnaepiteelilt kõikidel juhtudel [48]. Meie mõlema grupi patsientidel praktiliselt kõikidel esines kõrge antiadhesiivse MUC1 tase (Tabel 5). Kirjanduse andmed on siiski MUC1 osas vastuolulised, sest on näidatud endomeetriumi retseptioonifaasis nii MUC1 tõusu [82] kui ärakadumist uterodoomidelt [44; 81]. Samas eeldatakse, et inimesel MUC1 adhesioonibarjäär kaob ainult kitsalt implantatsiooniala kohal ja säilib mujal endomeetriumi epiteelil, enamikel loomadel aga kaob MUC1 kogu endomeetriumi ulatuses [83].

Tundub, et adhesioonibarjääri säilimise osas on enam informatiivne MUC16. Meie uuringus ilmnas nooremas vanusegrupis (grupp I) MUC16 selgelt tugevam ekspressioon kui vanemas patsientide grupis (Grupp II). Kui esimeses grupis MUC16 värvumuse intensiivsus varieerus tugevalt reaktsioonilt nõrgani, siis teise grupi patsientidel esines ainult ühel nõrk reaktsioon ja teistel reaktsioon puudus sootuks (Tabel 5). Seega MUC16 adhesioonibarjääri säilumine endomeetriumi ulatuses võib olla osadel noorema rühma patsientidel infertiilsust soodustavaks põhjuseks.

Peab ütlevat, et inimese endomeetriumi retseptiivsus uurimine on komplitseeritud ja paraku ei saa siin oluliselt toetuda loomeksperimentidele. Nimelt esinevad väga selged liigispetsiifilised iseärasused endomeetriumi ultrastruktuuris ja retseptiivsus markerites. Nii on pinopoodide struktuuris, suuruses, kujus ja ilmselt ka funktsioonis väga olulisi erinevusi inimese ja tavapäraste katseloomade (rott, hiir) vahel. Samamoodi tunduvad olevat olulised liigispetsiifilised iseärasused näiteks trofiniini ja MUC1 rollis. Samas inimese endomeetriumi uurimise muudavad keeruliseks eetilised piirangud, mistõttu uuritava materjali hulk on piiratud ja eriti komplitseeritud on materjali saamine võrdlusrühmadelt (kontrollrühmadelt).

Kokkuvõttes antud uurimuse kõiki hinnatud parameetreid vaadeldes võib öelda, et uuritud kümnel infertiilsusprobleemiga patsiendil esines suuremaid või vähemaid nihkeid endomeetriumi struktuuris ja/või retseptiivsus markerite osas. Nii ilmnas enim probleeme teise grupi patsientidel nr 1 ja 10, kellel oli kollaskeha puudulikkus (madal progesteroonitase), endomeetriumi pinnaepiteeli oluline kahjustus ja madal integriinide ja trofiniini tase. Teistel patsientidel nihked endomeetriumi osas ei olnud nii markantsed, kuid praktiliselt kõikidel ilmnas implantatsiooni mittesoodustavaid faktoreid – kas oli tegu faasi mahajäämusega, integriinide või trofiniini madala tasemega või MUC16 kõrge tasemega (Tabel 5). Kui esimese grupi patsiente iseloomustas antiadhesiivse MUC16 säilumine (eriti patsient nr 7), siis teist gruppi iseloomustab  $\beta_3$  integriini madal tase. Hinnates uuritud endomeetriumi retseptiivsus markereid tundub integriin  $\alpha_v\beta_3$  määramine olevat kliiniliselt kõige olulisem. Siiski arvestades, et implantatsioon on ajalisel ja ruumilisel keeruline blastotsüsti ja

endomeetriumi vaheline koordineeritud protsess, siis ka väiksemad nihked regulatsioonis võivad viia ebaõnnestunud embrüo pesastumisele. Seetõttu on ilmselt informatiivsem komplekselt hinnata endomeetriumi retseptiivsust kasutades traditsioonilist histoloogilist ja SEM uuringut ning immunohistokeemilist retseptiivsuse markerite määramist (eeskätt integriin  $\alpha_v\beta_3$ ) nagu on leidnud ka teised uurijad [69].

Tabel 5. Summaarne tabel endomeetriumi seisundit iseloomustavatest parameetritest uuritavatel patsientidel.

	Nr	P <sub>4</sub> tase normis	Faasi maha- jäämus	Pinnaepiteeli kahjustusi		Pinopoodid		Trofinain EK	MUC1 EK	MUC16 EK	$\beta_3$ integriin EK
				Valgus- mikros- koopia	SEM	Valgus- mikros- koopia	SEM				
Grupp I	2	+	+	-	-	-	-	2	4	1	1
	4	+	-	-	-	+	+	0	2	2	2
	5	+	-	-	+	-	-	1	3	1	1
	6	+	-	-	-	-	+	0	3	1	2
	7	+	+	-	-	-	-	2	2	4	2
x±SEM								1±0,5	2,8±0,4	1,8±0,6	1,6±0,3
Grupp II	3	+	+	-	-	+	+	0	2	0	1
	8	+	-	-	+	-	+	0	3	0	1
	9	+	-	-	-	-	+	1	3	0	0
	10	-/+	+	+	+	-	-	1	3	0	0
	1	-	+	+	-	-	-	1	3	1	0
x±SEM								0,6±0,3	2,8±0,2	0,2±0,2*	0,4±0,3*

P<sub>4</sub> – progesteron; EK – endomeetriumi katteepiteel;

0 – reaktsiooni puudumine; 1 – nõrk reaktsioon; 2 – mõõdukas reaktsioon; 3 – tugev reaktsioon; 4 – väga tugev reaktsioon;

\*P<0,05 grupp I vs grupp II.

## 8. JÄRELDUSED

1. Histoloogiliste uuringute alusel võis tuvastada viiel alla 34. aastasel patsiendil ja viiel üle 34. aastasel viljatul patsiendil, kes korduvalt läbisid edutult IVF protseduure erinevaid endomeetriumi struktuurseid muutusi ning kahel noorema ja kolmel vanema rühma patsiendil ilmnas menstruaaltsükli faasi mahajäämus.
2. Immunohistokeemilisel määramisel tuvastati trofoniini ja eriti  $\beta_3$  integriini madal tase vanema rühma patsientide endomeetriumi katte- ja näärmeepiteelis, mis tunnistab endomeetriumi piiratud adhesioonivõimet.
3. MUC1 tase oli kõrge mõlema rühma patsientide endomeetriumi katte- ja näärmeepiteelis, samas MUC16 tase oli selgelt kõrgem noorema rühma patsientidel, mis viitab adhesioonibarjääri säilumisele paljudel selle grupi uuritavatel patsientidel.
4. Skaneeriva elektronmikroskoopia abil leiti kahel noorema rühma ja kolme vanema rühma patsientide endomeetriumi rakkude apikaalsel pinnal pinopood, mida peetakse retseptiivse endomeetriumi tunnuseks, kuid mille tähtsus inimesel on veel lõplikult tõestamata.
5. Kompleksne analüüs, mis kombineerib histoloogilisi ja immunohistokeemilisi uuringuid ning skaneerivat elektronmikroskoopiat, annab endomeetriumi retseptiivsusest tervikliku pildi, mida üksikmeetodite rakendamine isoleeritult teha ei suuda.

## 9. KOKKUVÕTE

Töös uuriti kümne infertiilse naise endomeetriumi morfoloogiat ja retseptiivsuse markereid. Uuritavad patsiendid vanuses 28–40 aastat olid eelnevalt edutult läbinud IVF protseduure. Patsientidele teostati endomeetriumi biopsiad loomuliku menstruaaltsükli 7.-10. ovulatsioonijärgsel päeval. Endomeetriumi koeproove uuriti histoloogiliselt ja immunohistokeemiliselt ning skaneeriva elektronmikroskoobi abil. Immunohistokeemiliselt hinnati trofiniini,  $\beta_3$  integriini ja mutsiinide MUC1 ja MUC16 esinemist endomeetriumi katte- ja näärmeepiteelis. Patsiendid jaotati vanuse alusel kahte rühma – alla 34 aastased (grupp I; n=5) ja vanuses  $\geq 34$  aastat (grupp II; n=5).

Histoloogiliste uuringute alusel võis tuvastada uuritud kümnest patsiendist viiel menstruaaltsükli faasi mahajäämist, kahel patsiendil esimeses grupis ja kolmel patsiendil teises grupis. Enamiku patsientide endomeetriumi katte- ja näärmeepiteelis tuvastati  $\beta_3$  integriini ja trofiniini madal tase, mis annab tunnistust endomeetriumi piiratud adhesioonivõimest. Ainult ühel esimese grupi patsiendil oli väga kõrge integriini sisaldus endomeetriumi näärmeepiteelis. Teise grupi integriin  $\beta_3$  tase oli endomeetriumi katte- ja näärmeepiteelis tervikuna madal ( $P < 0,05$  vs grupp I). MUC1 tase oli kõrge mõlema grupi kõikide patsientide endomeetriumi katte- ja näärmeepiteelis. Seevastu MUC16 sisaldus oli kõrgem esimeses grupis ja praktiliselt puudus teises grupis, kus viiest patsiendist ainult ühel tuvastati nõrk reaktsioon. MUC16 kõrgem sisaldus viitab adhesioonibarjääri säilumisele paljudel esimese grupi patsientidel. Skaneeriva elektronmikroskoopia abil leiti viie patsiendi endomeetriumi rakkude apikaalsel pinnal pinopode (kahel esimese ja kolmel teise grupi patsientidel), mida peetakse retseptiivse endomeetriumi tunnuseks, kuid mille olulisus inimesel vajab veel lõplikku tõestamist.

Kompleksne analüüs, mis kombineerib histoloogilisi ja immunohistokeemilisi uuringuid ning skaneerivat elektronmikroskoopiat annab endomeetriumi retseptiivsusest tervikliku pildi, mille alusel võib öelda, et uuritud kümnel infertiilsusprobleemiga patsiendil esines suuremaid või vähemaid nihkeid endomeetriumi struktuuris ja/või markerite osas. Kahel teise grupi patsientidel esines kollaskeha puudulikkus (madal progesteroonitase), endomeetriumi pinnaepiteeli oluline kahjustus ja madal integriinide ja trofiniini tase. Teistel patsientidel nihked endomeetriumi osas ei olnud nii markantsed, kuid praktiliselt kõikidel ilmnis implantatsiooni mittesoodustavaid faktoreid – kas oli tegu faasi mahajäämusega, integriinide või trofiniini madala tasemega või adhesioonibarjääri moodustava MUC16 kõrge tasemega.

## 10. SUMMARY

### **Changes in the endometrial epithelial cells of patients who have underwent several unsuccessful IVF procedures**

In this study endometrial morphology and markers of receptivity of ten infertile patients were investigated. The patients (the age from 28 to 40 years) have undergone unsuccessful IVF procedures. Endometrial biopsies were performed on postovulatory days 7-10 of the natural menstrual cycle. Endometrial specimens were studied by histological and immunohistochemical (IHC) methods and by means of scanning electron microscopy (SEM). Presence of trophinin,  $\beta_3$  integrin, mucins MUC1 and MUC16 in the endometrial surface epithelium and in the glandular epithelium was assessed by IHC. According to the age patients were divided into two groups – younger than 34 years (Group I; n=5) and in the age  $\geq 34$  (Group II; n=5).

Histological analysis revealed delay of the menstrual cycle in five patients out of ten, in two patients of Group I and in three patients of Group II. Low level of trophinin and  $\beta_3$  integrin was estimated in the endometrial epithelial cells in most patients, which reflects reduced endometrial capacity for adhesion. Only one patient of Group I had very high level of integrin in the endometrial glandular epithelium. Level of  $\beta_3$  integrin was generally low in the endometrial surface and glandular epithelium in Group II ( $P < 0,05$  vs Group I). MUC1 content was high in the endometrial epithelial cells of all patients of both groups. In the other hand MUC16 level was higher in Group I and was practically lacking in Group II, where only one patient out of five had weak reaction. Higher content of MUC16 demonstrates persistence of the adhesion barrier in Group I. SEM investigation demonstrated pinopodes on the luminal surface of endometrial epithelial cells in five patients (two in Group I and three in Group II). Pinopodes are believed to be markers of endometrial receptivity, but their precise function in humans is still debated.

Complex analysis applied in this study, which combines histological, IHC and SEM methods gives good overview of the receptivity of the endometrium. The analysis demonstrates that all ten patients with the infertility problem had changes in the structure of the endometrium and/or in markers of receptivity. Two patients of Group II had malfunction of corpus luteum (low progesterone level), significant damage of the surface epithelium and low level of  $\beta_3$  integrin and trophinin. In the other patients endometrial changes were not that dramatic, but still all showed some unfavorable factors for implantation – delay of the menstrual cycle, low level of integrins or trophinin, or high level of adhesion barrier forming MUC16.

## 12. KASUTATUD KIRJANDUS

1. „Sünnitusabi ja günekoloogia” tõlkinud Ehrenberg A; Kirss F; Parve M; Kirss A; Poolamets O; *Medicina* 2008, lk. 177-196
2. Haller-Kikkatalo, K.; Sarapik, A.; Salumets, A.; Uibo R. Autoimmuunsus ja naise viljatus I. Soodumus autoimmuunsete reaktsioonide tekkeks. *Eesti Arst.* **2009**, 88, 14-19.
3. Eesti Haigekassa <http://www.haigekassa.ee/kindlustatule/tervishoid/ivf/info/> viimati uuendatud 5. august 2010. a
4. Arend, A. *Histoloogia loengud*; <http://biomedicum.ut.ee/aran/histoL.html> viimati uuendatud 07.02.2010
5. Kalinina, A.; Matt, K. Autoantikehade osa naiseviljatuse tekkes. *Eesti Arst.* **2003**, 82, 172-176.
6. Matt, K. See infertiilsus... *Hippokrates.* **1999**, 7, 406-409.
7. Aspects of sexuality and family planning. Module 7. Guidelines on diagnosis and treatment of infertility. *WHO.* **1989**.
8. WHO Technical Report Series 820. Recent advances in medically assisted conception. Geneva. **1992**. P2.
9. Karro H. „Menstruaaltsükli hormonaalne regulatsioon. Puberteet.” õppematerjal arstiteaduskonna tudengitele, viimati uuendatud 6. september 2006. a.
10. Puolakkainen, M. Chlamydia trachomatis and herpes simplex virus infections during pregnancy. *Katilolehti.* **1986**, 91, 243-245.
11. Rahm, V.A.; Gnarpe, H.; Odland V. Chlamydia trachomatis among sexually active teenage girls. Lack of correlation between chlamydial infection, history of the patient and clinical signs of infection. *Br J Obstet Gynaecol.* **1988**, 95, 916-919.
12. Ross M.H.; Pawlina W. *Histology: a text and atlas.* Lippincott Williams & Wilkins, **2006**.
13. Hsu, C.; Ferenczy, A.; Richart, R.M.; Darabi, K. Endometrial morphology with copper-bearing intrauterine devices. *Contraception.* **1976**, 14, 43-60.
14. Sarani, S.A.; Ghaffari-Novin, M.; Warren, M.A.; Dockery, P.; Cooke, I.D. Morphological evidence for the „implantation window” in human luminal endometrium” *Hum Reprod.* **1999**, 14, 3101-3106.

15. Hoozemans, D.A.; Schats, R.; Lambalk, C.B.; Homburg, R.; Hompes, P.G. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online*. **2004**, *9*, 692-715.
16. Nikas, G. Endometrial receptivity: changes in cell-surface morphology. *Semin Reprod Med*. **2000**, *18*, 229-235.
17. Guzeloglu-Kayisli, O.; Basar, M.; Arici, A. Basic aspects of implantation. *Reprod Biomed Online*. **2007**, *15*, 728-739.
18. Thie, M.; Röspel, R.; Dettmann, W.; Benoit, M.; Ludwig, M.; Gaub, H.E.; Denker, H.W. Interactions between trophoblast and uterine epithelium: monitoring of adhesive forces. *Hum Reprod*. **1998**, *13*, 3211-3219.
19. Arend, A. Histoloogia loengud, viimati muudetud sept. **2008**.  
([www.biomedicum/aran/histoloogia/](http://www.biomedicum/aran/histoloogia/))
20. Suuroia T, Aunapuu M, Arend A, Sepp E. "Light" epithelial cells of swine and bovine oviducts. *Tsitologia*. **2002**, *44*(7), 656-60.
21. Critoph FN, Dennis KJ. Ciliary activity in the human oviduct. *Br J Obstet Gynaecol*. **1977**, *84*, 216–218.
22. Lyons RA, Djahanbakhch O, Mahmood T, Saridogan E, Sattar S, Sheaff MT, Naftalin AA, Chenoy R. Fallopian tube ciliary beat frequency in relation to the stage of menstrual cycle and anatomical site. *Hum Reprod*. **2002**, *17*, 584–588.
23. Meseguer, M.; Pellicer, A.; Simon, C. MUC1 and endometrial receptivity. *Mol Hum Reprod*. **1998**, *4*, 1089-1098.
24. Pinon R. Biology of Human Reproduction. University Science Books, Sausalito, California, **2002**.
25. Nardo, L.G.; Sabatini, L.; Rai, R.; Nardo, F. Pinopode expression during human implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. **2002**, *101*, 104-108.
26. Enders, A.C.; Nelson, D.M. Pinocytotic activity of the uterus of the rat. *Am J Anat*. **1973**, *138*, 277-299.
27. Nikas, G.; Develioglu, O.H.; Toner, J.P.; Jones H.W. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod*. **1999**, *14*, 787-792.
28. Quinn, C.E.; Casper, R.F. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Hum Reprod Update*. **2009**, *15*, 229-236.
29. Murphy CR. Understanding the apical surface markers of uterine receptivity: pinopodes or uterodomes? *Hum. Reprod*. **2000**, *15*, 2451-2454.



30. Nikas, G.; Psychoyos, A. Uterine pinopodes in peri-implantation human endometrium. Clinical relevance. *Ann NY Acad Sci.* **1997**, *816*, 129-142.
31. Nikas, G.; Aghajanova, L. Endometrial pinopodes: some more understanding on human implantation? *Repro. Biomed Online.* **2002**, *4*, 18-23.
32. Johannisson, E.; Nilsson, L. Scanning electron microscopic study of the human endometrium. *Fertil Steril.* **1972**, *23*, 613-625.
33. Nikas, G. Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. *Hum Reprod.* **1999**, *14*, 99-106.
34. Develioglu, O.H.; Nikas, G.; Hsiu, J.G.; Toner, J.P.; Jones H.W. Detection of endometrial pinopodes by light microscopy. *Reprod Biol.* **2000**, *74*, 767-770.
35. Oborná, I.; Novotný, R.; Brezinová, J.; Petrová, P.; Lichnovský, V.; Fingerová, H. Changes in the development of uterine pinopodes in steroid hormone supplemented cycles. *Physiol Res.* **2004**, *53*, 423-429.
36. Usadi, R.S.; Murray, M.J.; Bagnell, R.C.; Fritz, M.A.; Kowalik, A.I.; Meyer, W.R.; Lessey, B.A. Temporal and morphologic characteristics of pinopode expression across the secretory phase of the endometrial cycle in normally cycling women with proven fertility. *Fertil Steril.* **2003**, *79*, 970-974.
37. 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*, 808-814.
38. Quinn, C.; Ryan, E.; Claessens, E.A.; Greenblatt, E.; Hawrylyshyn, P.; Cruickshank, B.; Hannam, T.; Dunk, C.; Casper, R.F. The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window. *Fertil Steril.* **2007**, *87*, 1015-1021.
39. Creus, M.; Ordi, J.; Fábregues, F.; Casamitjana, R.; Carmona, F.; Cardesa, A.; Vanrell, J.A.; Balasch, J. The effect of different hormone therapies on integrin expression and pinopode formation in the human endometrium: a controlled study. *Hum Reprod.* **2003**, *18*, 683-693.
40. Nardo, L.G.; Nikas, G.; Makrigiannakis, A.; Sinatra, F.; Nardo, F. Synchronous expression of pinopodes and alpha v beta 3 and alpha 4 beta 1 integrins in the endometrial surface epithelium of normally menstruating women during the implantation window. *J Reprod Med.* **2003**, *48*, 355-361.
41. Creus, M.; Ordi, J.; Fábregues, F.; Casamitjana, R.; Ferrer, B.; Coll, E.; Vanrell, J.A.; Balasch, J. (alpha)v(beta)3 integrin expression and pinopod formation in normal and

- out-of-phase endometria of fertile and infertile women. *Hum Reprod.* **2002**, *17*, 2279-2286.
42. Aplin, J.D. Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive. *Dec Reprod Biomed Online.* **2006**, *13*, 833-839.
43. Hey, N.A.; Li, T.C.; Devine, P.L.; Graham, R.A.; Saravelos, H.; Aplin, J.D. MUC1 in secretory phase endometrium: expression in precisely dated biopsies and flushings from normal and recurrent miscarriage patients. *Hum Reprod.* **1995**, *10*, 2655-2662.
44. Horne, A.W.; Lalani, E.N.; Margara, R.A.; Ryder, T.A.; Mobberley, M.A.; White, J.O. The expression pattern of MUC1 glycoforms and other biomarkers of endometrial receptivity in fertile and infertile women. *Mol Repro. Dev.* **2005**, *72*, 216-229.
45. Brayman MJ, Dharmaraj N, Lagow E, Carson DD. MUC1 expression is repressed by protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription- $\gamma$ . *Mol Endocrinol.* **2007**, *21(11)*, 2725-37.
46. Bazer F.W.; Wu G.; Spencer T.E.; Johnson G.A.; Burghardt R.C.; Bayless K. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Mol Hum Reprod.* **2010**, *16(3)*, 135-52.
47. Yin, B.W.T.; Lloyd, K.O. Molecular Cloning of the CA125 Ovarian Cancer Antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem.* **2001**, *276*, 27371–27375.
48. Gipson, I.K.; Blalock, T.; Tisdale, A.; Spurr-Michaud, S.; Allcorn, S.; Stavreus-Evers, A.; Gemzell, K. MUC16 is lost from the uterodome (pinopode) surface of the receptive human endometrium: in vitro evidence that MUC16 is a barrier to trophoblast adherence. *Biol Reprod.* **2008**, *78*, 134-142.
49. Nadano D.; Sugihara K.; Paria B.C.; Saburi S.; Copeland N.G.; Gilbert D.J.; Jenkins N.A.; Nakayama J.; Fukuda M.N. Significant differences between mouse and human trophinins are revealed by their expression patterns and targeted disruption of mouse trophinin gene. *Biol Reprod* **2002**, *66*, 313-21.
50. Nakayama, J.; Aoki, D.; Suga, T.; Akama, T.O.; Ishizone, S.; Yamaguchi, H.; Imakawa, K.; Nadano, D.; Fazleabas, A.T.; Katsuyama, T.; Nozawa, S.; Fukuda, M.N. Implantation-Dependent Expression of Trophinin by Maternal Fallopian Tube Epithelia during Tubal Pregnancies. *Am J Pathol.* **2003**. *163*, 2211-9
51. Suzuki, N.; Nakayama, J.; Shih, I.M.; Aoki, D.; Nozawa, S.; Fukuda, M.N. Expression of Trophinin, Tastin, and Bystin by Trophoblast and Endometrial Cells in Human Placenta. *Biol Reprod.* **1999**, *60*, 621–627.

52. Fukuda M.N.; Sugihara K.; Nakayama J. Trophinin: what embryo implantation teaches us about human cancer. *Cancer Biol Ther.* **2008**, *7(8)*, 1165.
53. Grosskinsky, C.M.; Yowell, C.W.; Sun, J.; Parise, L.V.; Lessey, B.A. Modulation of integrin expression in endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* **1996**, *81*, 2047-2054.
54. Ruoslahti, E. Integrins. *J. Clin. Invest.* **1991**, *87*, 1–5.
55. Lessey, B.A.; Damjanovich, L.; Coutifaris, C.; Castelbaum, A.; Albelda, S.M.; Buck C.A. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *Clin Invest.* **1992**, *90*, 188–195.
56. Sülz, L.; Valenzuela, J.P.; Salvatierra, A.M.; Ortiz, M.E.; Croxatto, H.B. The expression of  $\alpha_v$  and  $\beta_3$  integrin subunits in the normal human Fallopian tube epithelium suggests the occurrence of a tubal implantation window. *Hum Reprod.* **1998**, *13*, 2916-2920.
57. Wang, J.; Armant, D.R. Integrin-mediated adhesion and signaling during blastocyst implantation. *Cells Tissues Organs.* **2002**, *172*, 190-201.
58. Merviel P.; Lourdel E.; Cabry R.; Boulard V.; Brzakowski M.; Demailly P.; Brasseur F.; Copin H.; Devaux A. Physiopathology of human embryonic implantation: clinical incidences. *Folia Histochem Cytobiol.* **2009**, *47(5)*, S25-34
59. 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.
60. Thomas, K.; Thomson, A.; Wood, S.; Kingsland, C.; Vince, G.; Lewin-Jones, I. Endometrial integrin expression in women undergoing in vitro fertilization and the association with subsequent treatment outcome. *Fertil Steril.* **2003**, *80*, 502-507.
61. Lessey, B.A.; Castelbaum, A.J. Integrins in the endometrium of women with endometriosis. *Br J Obstet Gynaecol.* **1995**, *102*, 347-348.
62. SA Tartu Ülikooli Kliinikum Ühendlabori kvaliteedi käsiraamat  
<http://www.kliinikum.ee/yhendlabor/dokumendid/T%C3%9CL-14.3%20Immunoloogia%20erialaliini%20referentsv%C3%A4%C3%A4rtused%20ver.09.pdf> viimati muudetud 23.02.2010
63. Noyes, R.W.; Hertig, A.T.; Rock, J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril.* **1950**, *1*, 3–25.
64. Groll J.M.; Usadi R.S.; Lessey B.A.; Lininger R.; Young S.L.; Fritz M.A. Effects of variations in serum estradiol concentrations on secretory endometrial development and

- function in experimentally induced cycles in normal women. *Fertil Steril*. **2009**, 92(6), 2058-61.
65. Usadi R.S.; Groll J.M.; Lessey B.A.; Lininger R.A.; Zaino R.J.; Fritz M.A.; Young S.L. Endometrial development and function in experimentally induced luteal phase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. **2008**, 93(10), 4058-64.
  66. Coutifaris, C.; Myers, E.R.; Guzick, D.S.; Diamond, M.P.; Carson, S.A.; Legro, R.S.; McCovert P.G.; Schlaff, W.D.; Carr, B.R.; Steinkampf, M.P.; Silva, S.; Vogel, D.L.; Leppert, P.C. Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil Steril*. **2004**, 82, 1264-1272.
  67. Murray M.J.; Meyer W.R.; Zaino R.J.; Lessey B.A.; Novotny D.B.; Ireland K.; Zeng D.; Fritz M.A. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril*. **2004**, 81(5), 1333-43.
  68. Bourgain, C.; Devroey, P. The endometrium in stimulated cycles for IVF. *Hum Reprod Update*. **2003**, 9, 515-522.
  69. Thomas K.; Thomson A.J.; Wood S.J.; Kingsland C.R.; Vince G.; Lewis-Jones D.I. Endometrial integrin expression in women undergoing IVF and ICSI: a comparison of the two groups and fertile controls. *Hum Reprod*. **2003**, 18(2), 364-9.
  70. Lim A.S.; Tsakok M.F. Age-related decline in fertility: a link to degenerative oocytes? *Fertil Steril*. **1997**, 68(2), 265-71
  71. Rosenwaks Z.; Davis O.K.; Damario M.A. The role of maternal age in assisted reproduction. *Hum Reprod*. **1995**, 10 Suppl 1, 165-73.
  72. Preutthipan S.; Amso N.; Curtis P.; Shaw R.W. Effect of maternal age on clinical outcome in women undergoing in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET). *J Med Assoc Thai*. **1996**, 79(6), 347-52.
  73. Fogle R.H.; Li A.; Paulson R.J. Modulation of HOXA10 and other markers of endometrial receptivity by age and human chorionic gonadotropin in an endometrial explant model. *Fertil Steril*. **2010**, 93(4), 1255-9.
  74. Pantos, K.; Nikas, G.; Makrakis, E.; Stavrou, D.; Karantzis, P.; Grammatidis, M. Clinical value of endometrial pinopodes detection in artificial donation cycles. *Reprod Biomed Online*. **2004**, 9, 86-90.
  75. Ordi, J.; Creus, M.; Casamitjana, R.; Cardesa, A.; Vanrell, J.A.; Balasch, J. Endometrial pinopode and alpha v beta 3 integrin expression is not impaired in infertile patients with endometriosis. *J Assist Reprod Genet*. **2003**, 20, 465-473.

76. Nikas, G. Cell-surface morphological events relevant to human implantation. *Hum Reprod.* **1999**, *14*, 37-44.
77. Wang H.Y.; Xing F.Q.; Chen S.L. Expression of trophinin in the cycling endometrium and its association with infertility. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* **2002**, *22(6)*, 539-41.
78. Sugihara K.; Kabir-Salmani M.; Byrne J.; Wolf D.P.; Lessey B.; Iwashita M.; Aoki D.; Nakayama J.; Fukuda M.N. Induction of trophinin in human endometrial surface epithelia by CGbeta and IL-1beta. *FEBS Lett.* **2008**, *582(2)*, 197-202.
79. Makker A.; Tandon I.; Goel M.M.; Singh M.; Singh M.M. Effect of ormeloxifene, a selective estrogen receptor modulator, on biomarkers of endometrial receptivity and pinopode development and its relation to fertility and infertility in Indian subjects. *Fertil Steril.* **2009**, *91(6)*, 2298-307.
80. Boroujerdnia MG, Nikbakht R. Beta3 integrin expression within uterine endometrium and its relationship with unexplained infertility. *Pak J Biol Sci.* **2008**, *11(21)*, 2495-9.
81. Horne, A.W.; White, J.O.; Lalani E.N.; Mobberley, M.A.; Margara, R.A.; Trew G.H.; Ryder T.A. Analysis of Epitopes on Endometrial Epithelium by Scanning Immunoelectron Microscopy. *Biochem Biophys Res.* **2002**, *292(1)*, 102-8.
82. Aplin J.D.; Hey N.A.; Graham R.A. Human endometrial MUC1 carries keratan sulfate: characteristic glycoforms in the luminal epithelium at receptivity. *Glycobiology.* **1998**, *8(3)*, 269-76.
83. Meseguer M.; Aplin J.D.; Caballero-Campo P.; O'Connor J.E.; Martín J.C.; Remohí J.; Pellicer A.; Simón C. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod.* **2001**, *64(2)*, 590-601.

## 12. TÄNUAVALDUSED

Töö on valminud Tartu Ülikooli arstiteaduskonna anatoomia instituudis ajavahemikul 2008-2010.a. Teadustööd finantseeriti ETF grandist 7301.

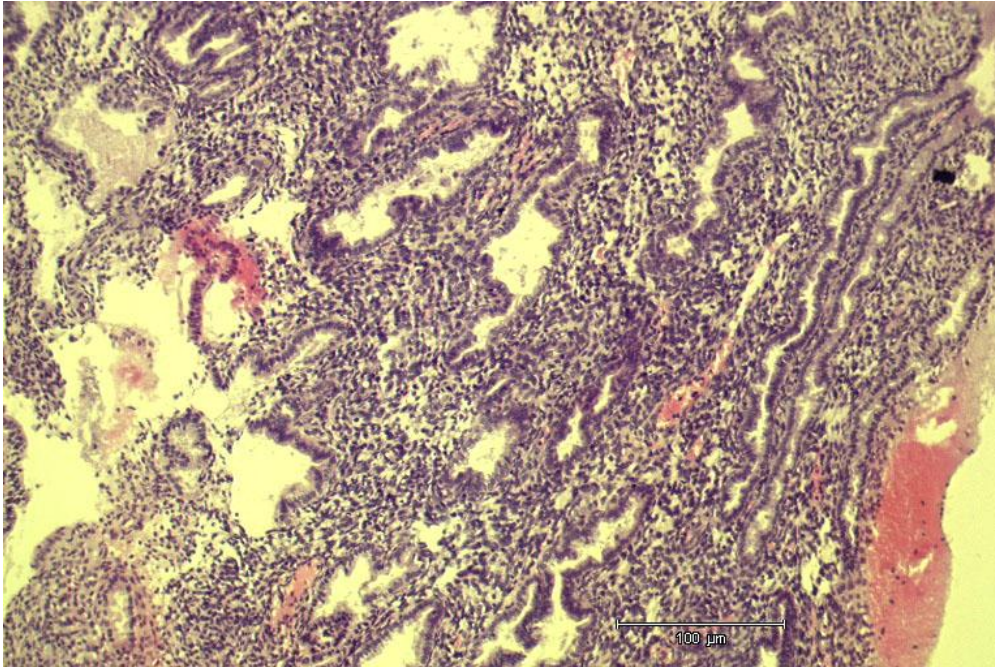
Täna juhendajaid dotsent Marina Aunapuud ja professor Andres Arendit võimaluse eest teha magistritööd paralleelselt põhiõpingutega ravi erialal. Täna ka igati mõistva suhtumise eest ning võimaluste eest esineda ettekannetega mitmel teaduskonverentsil Eestis ja välismaal. Eriti on jäänud meelde kiitvad hinnangud meie ettekande kohta rahvusvaheliselt üliõpilaste konverentsilt Hollandis.

Täna professor Andres Salumetsa abi eest uurimismaterjali korjamisel.

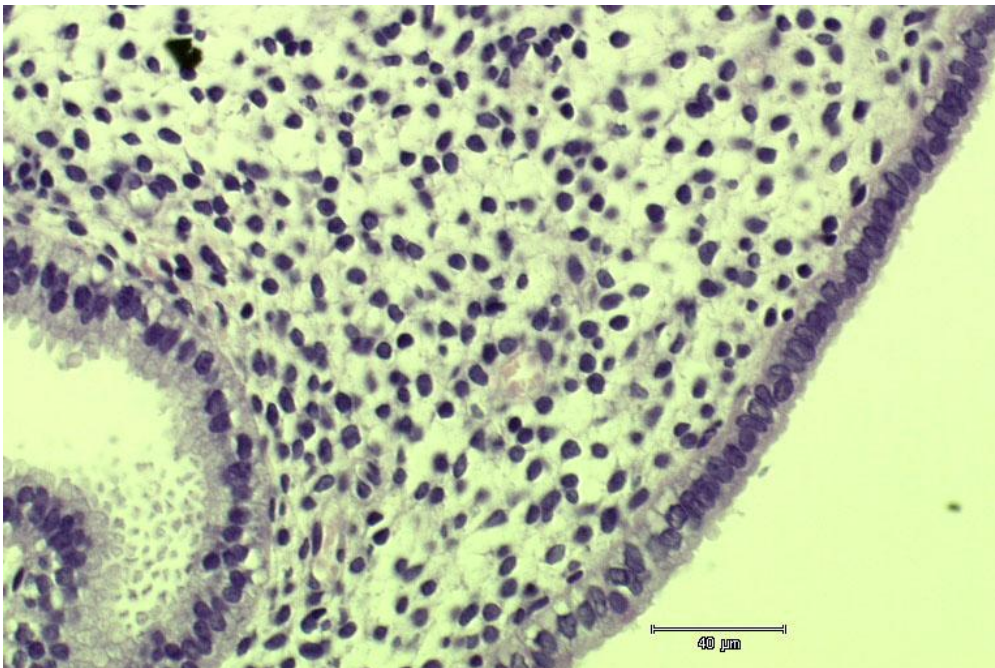
Täna lektor Tõnu Järveotsa (EMÜ) õpetamise ja abi eest SEM uuringute tegemisel.

## 13. LISAD

### 13.1. Histoloogiliste uuringute joonised

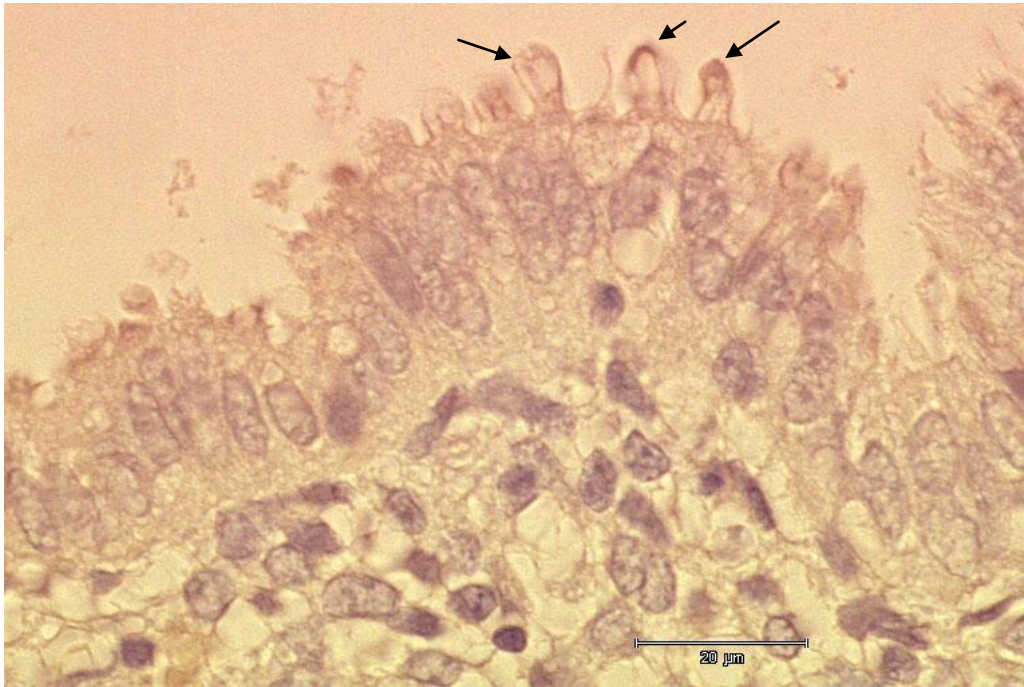


Joonis 1. Hilises sekretsioonifaasis (25.-26. päev) võetud emaka biopsia. Näärmete-strooma suhe on normis (1:1). Nähtavad on spiraalarterid. Värving: H&E.



Joonis 2. Korrapärane ühekihiline prismaatiline epiteel katab endomeetriumi pinda. Värving: H&E.

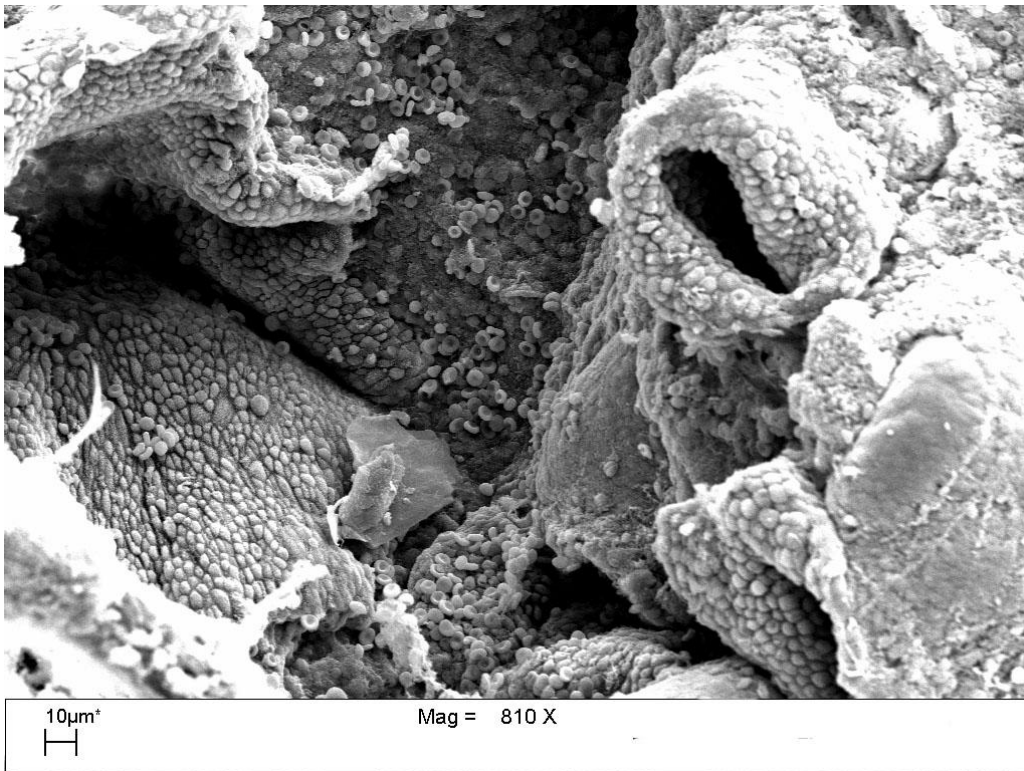




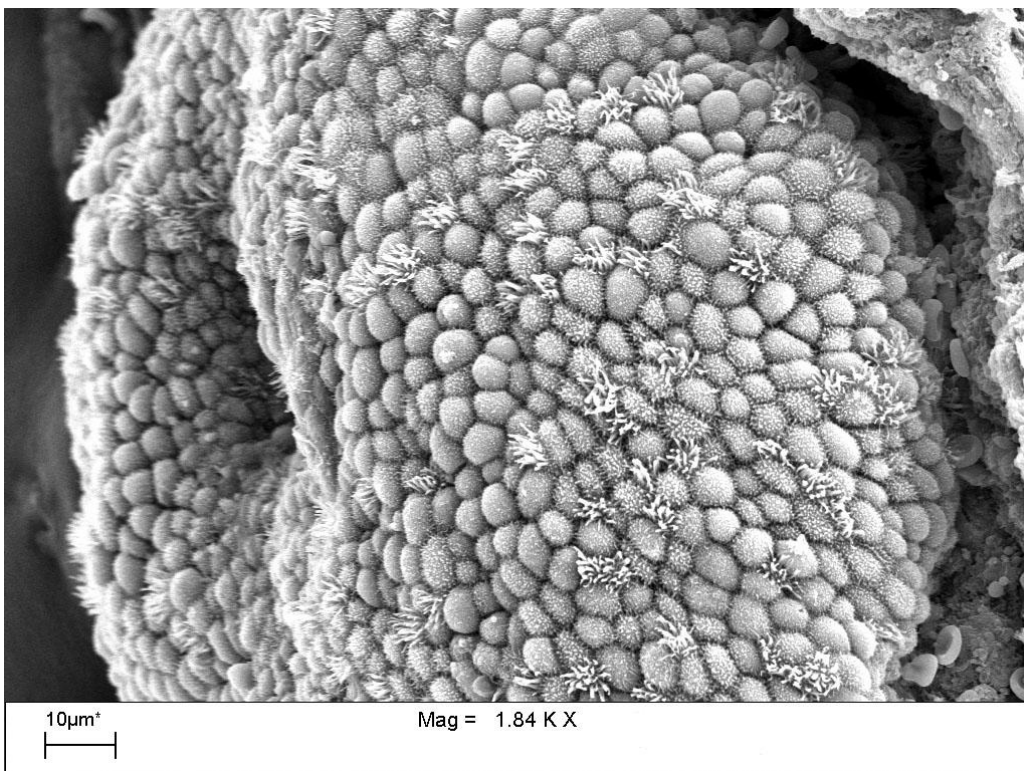
Joonis 3. Pinopoodid (nooled) epiteelirakku apikaalsel pinnal. Värving: hemalaun.



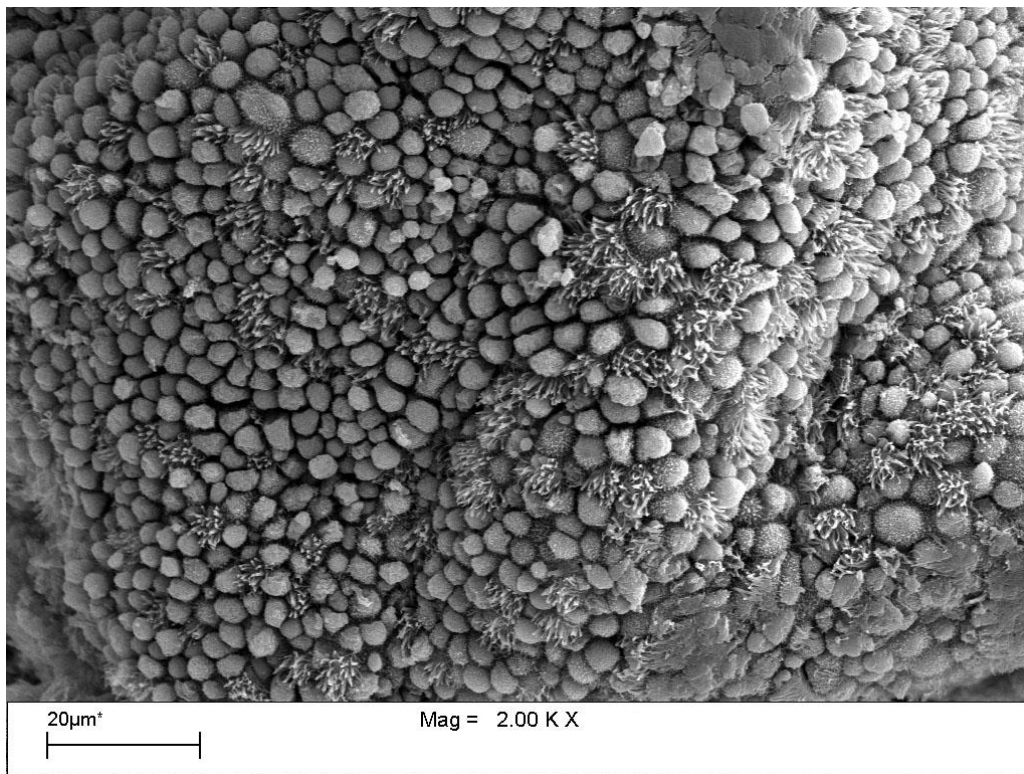
### 13.2. SEM uuringute joonised



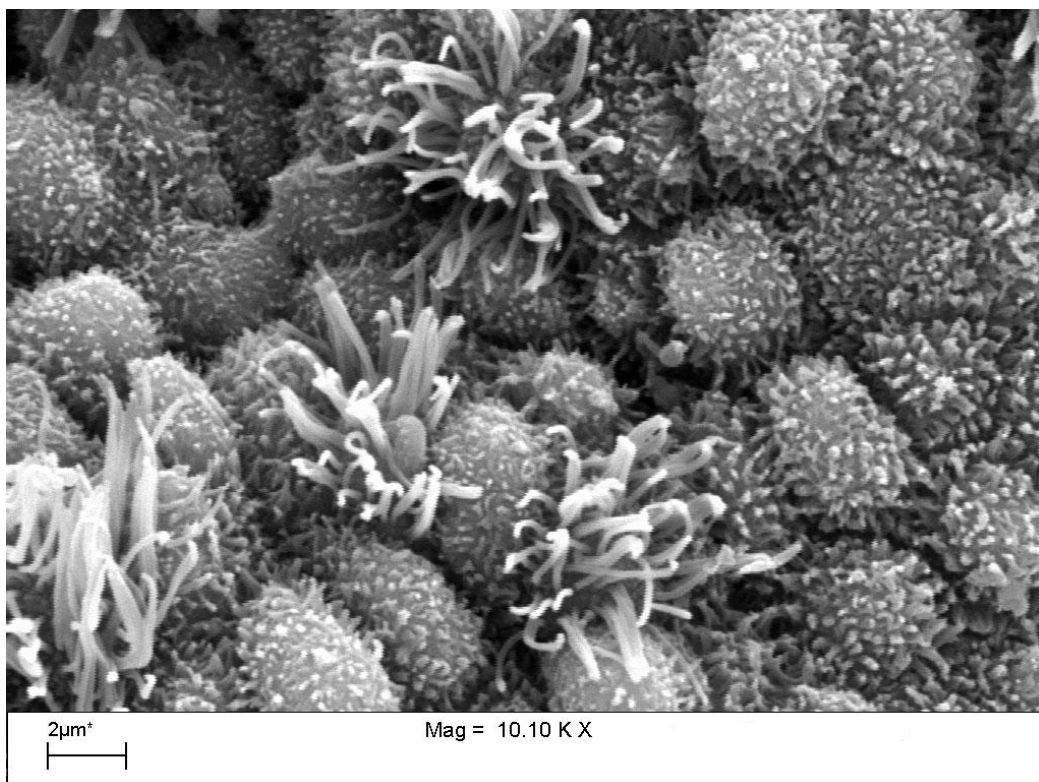
Joonis 4. Endomeetriumi pind, nähtavad on emakanäärmed. SEM.



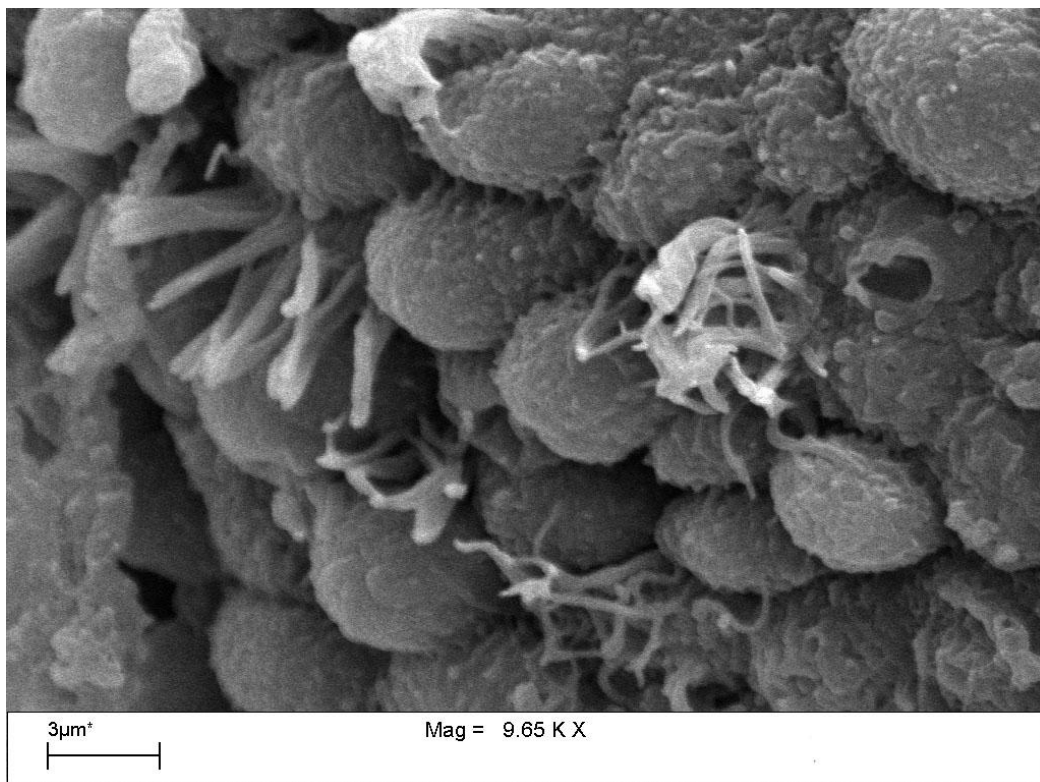
Joonis 5. Emakanääre korrapäraselt paiknevate ripsepiteeli- ja sekretoorsete rakkudega. SEM.



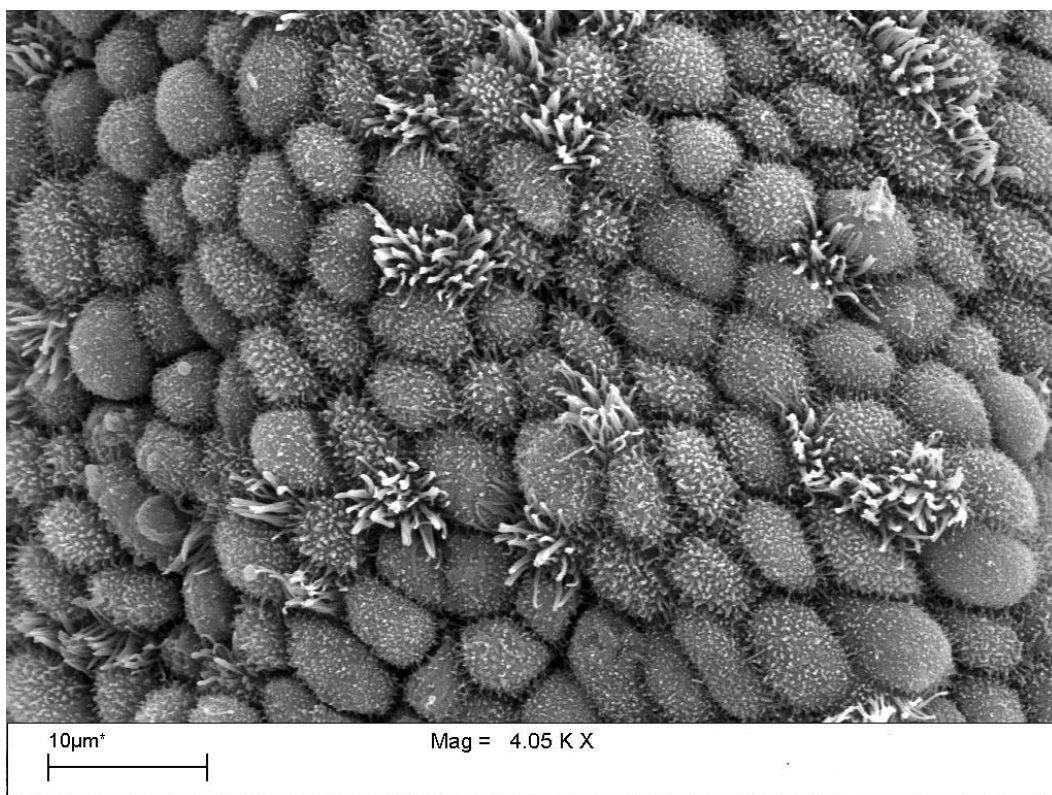
Joonis 6. TFI patsiendi endomeetriumi epiteelirakud korrapärase mikrohattude, ripsmete ja pinopoodidega. SEM.



Joonis 7. Korrapäraselt arenenud pikad ripsmed ja mikrohatud endomeetriumi epiteelirakkude apikaalsel pinnal. SEM.



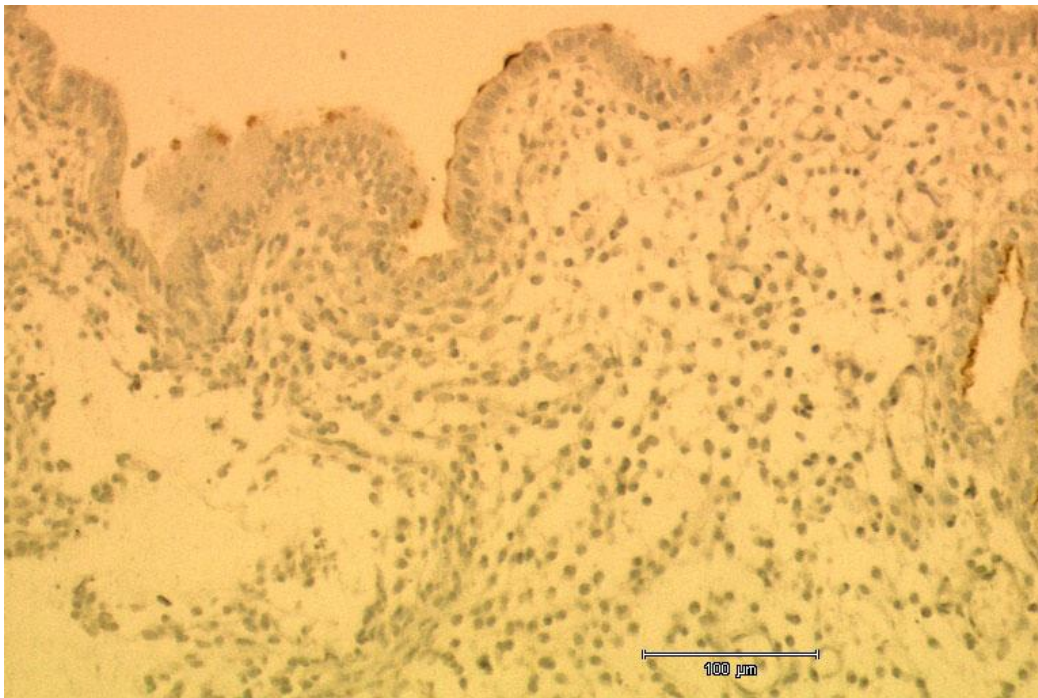
Joonis 8. Salkus ripsmetega, ilma mikrohattudeta „paljad” epiteelirakud. SEM.



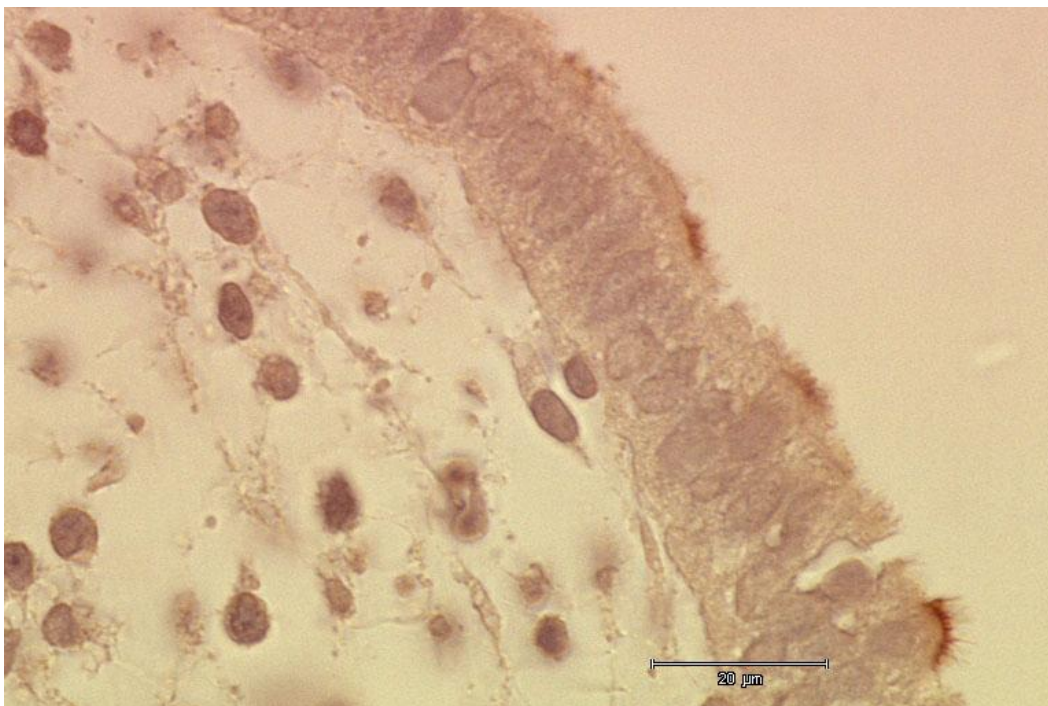
Joonis 9. Endomeetriumi korrapärased rips- ja sekretoorsed epiteelirakud. SEM.



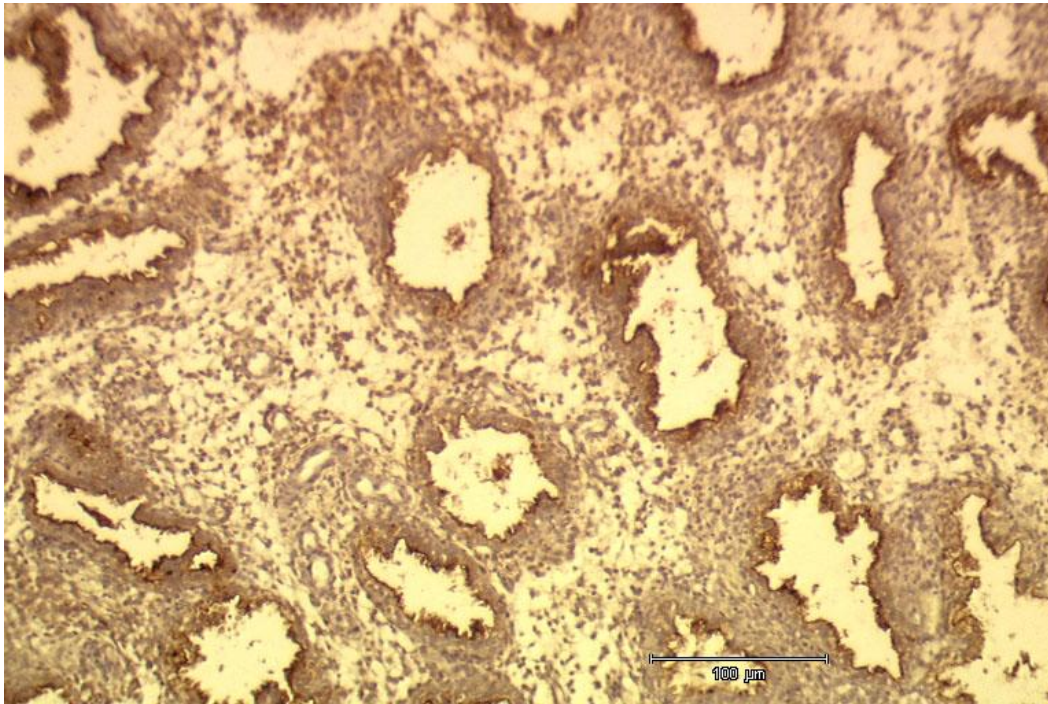
### 13.3. Immunohistokeemiliste uuringute joonised



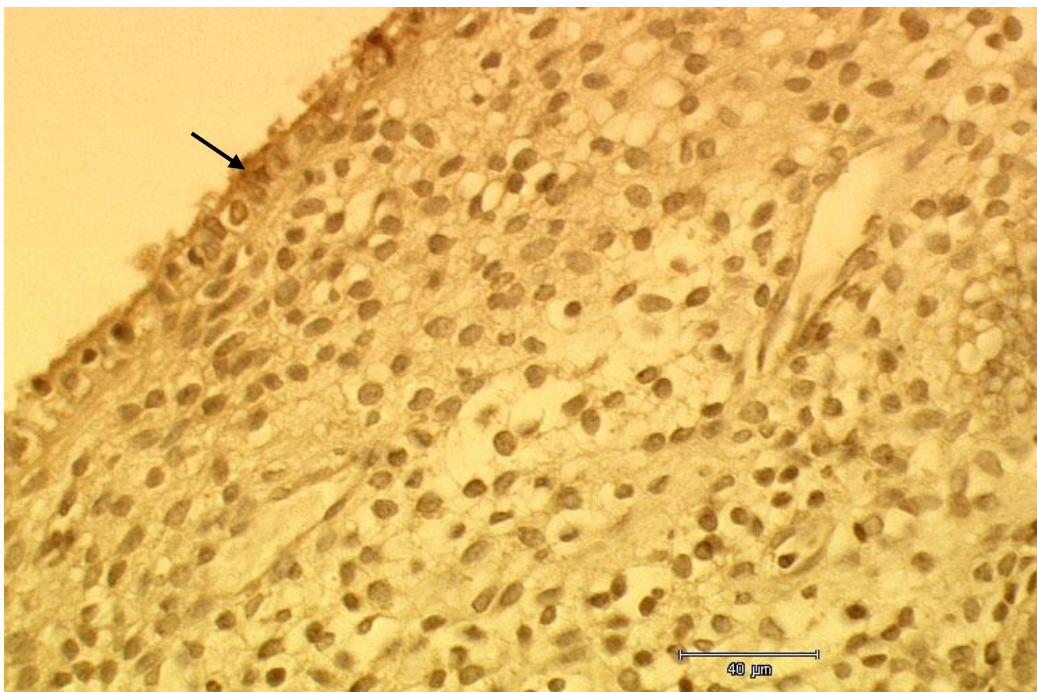
Joonis 10. MUC1 positiivne reaktsioon epiteelirakkude apikaalsel pinnal. Värving: DAB+hemalaun.



Joonis 11. MUC1 positiivne reaktsioon epiteelirakkude apikaalsel pinnal. Värving: DAB+hemalaun.

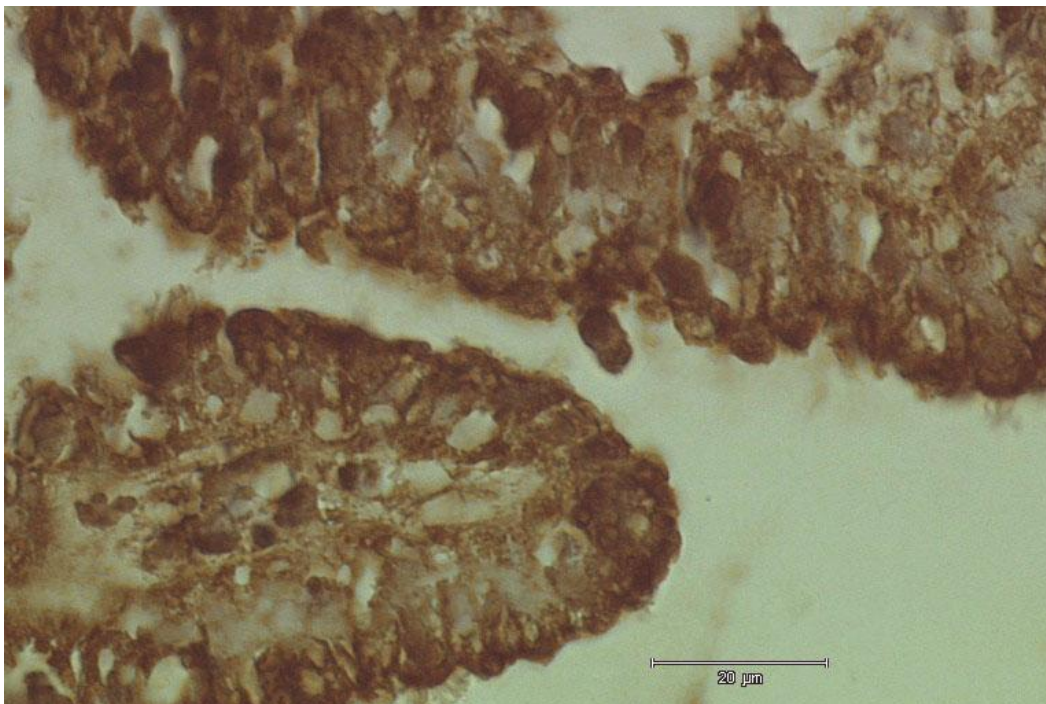


Joonis 12. MUC1 positiivne reaktsioon emakanäärmete epiteelirakkude apikaalsel pinnal.  
Värving: DAB+hemalaun.

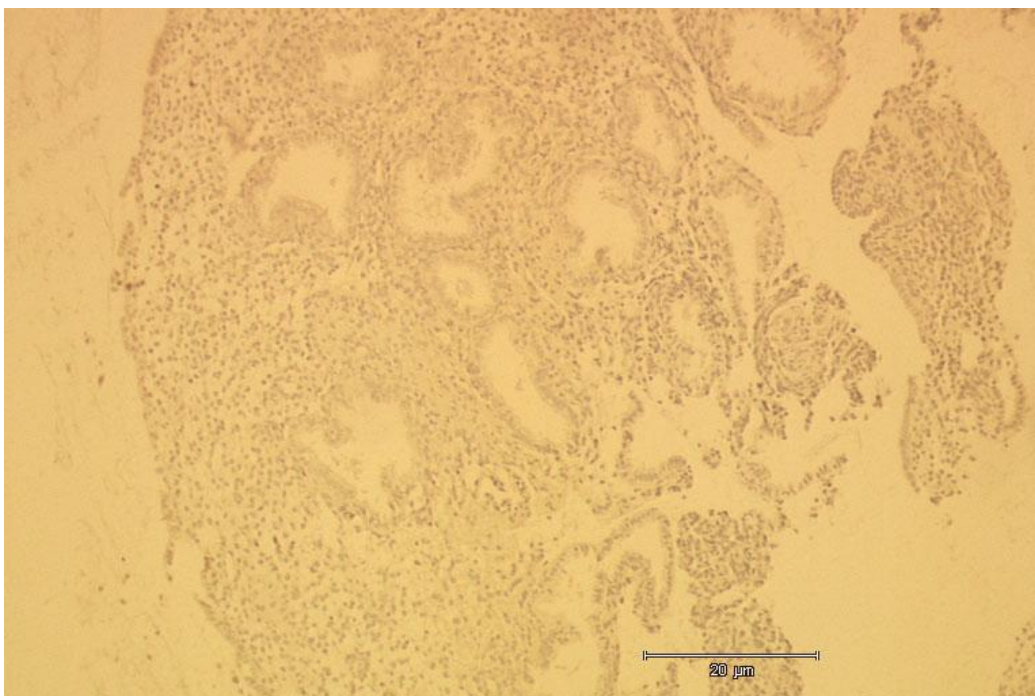


Joonis 13. Trofiniini minimaalselt positiivne reaktsioon endomeetriumi katteepiteelis (nool).  
Värving: DAB + hematoksülin.





Joonis 14. Väga tugev integriin  $\beta_3$  immunohistokeemiline reaktsioon ühe patsiendi biopsias. Värving: DAB+hemalaun.



Joonis 15. MUC16 immunohistokeemiline reaktsioon endomeetriumi biopsiates oli negatiivne kolmel patsiendil. Värving: DAB+hemalaun.