

ZDOLNOŚĆ ZARODKÓW DO DEGRANULOWANIA KOMÓREK
TUCZNYCH MACICY I PRZYPUSZCZALNA ROLA TEGO PROCESU
W MATCZYNO-ZARODKOWYM WSPÓŁDZIAŁANIU W OKRESIE IMPLANTACJI

Alicja Choroszevska

Pracownia Embriologii Doświadczalnej,
Zakład Histologii i Embriologii AM, Warszawa

WSTĘP

Pierwszym sygnałem do rozpoczęcia decidualizacji i implantacji u ciężarnych szczurów jest zetknięcie się dojrzałych, pozbawionych otoczek przejrzystych blastocyst z nabłonkiem błony śluzowej macicy. Istnieje wiele teorii mających na celu wyjaśnienie, jaki mechanizm powoduje transformację komórek stromy w komórki decidualne oraz sprawia, że macica staje się receptywna dla zarodków. Między innymi sugeruje się, że w czasie przylegania blastocyst do ściany macicy i pod ich wpływem wytwarza się specyficzny czynnik, indukujący decidualizację i implantację [6] lub, że w hormonalnie przygotowanej /uczulonej/ macicy wytwarzają się warunki fizykochemiczne, w których komórki stromy są zdolne do transformacji w komórki decidualne pod wpływem bodźca zarodkowego [7]. Po wszczęciu się zarodka w ścianę macicy rozpoczyna się współdziałanie między komórkami trofoblastu i komórkami błony śluzowej macicy. Mechanizm tego współdziałania jest bardzo złożony i nie został jeszcze w całości poznany. Przypuszcza się, że uczestniczy w tym szereg substancji pochodzących od matki i zarodka, a wśród nich bardzo ważną rolę wydają się odgrywać histamina [9, 18] i prostaglandyny [10-12]. Źródłem tych związków w macicy są, między innymi, komórki tuczne /rys. 1, 2/. Są to wysoko wyspecjalizowane komórki tkanki łącznej, syntetyzujące i /lub/ przechowujące w cytoplazmatycznych granulach liczne biologicznie czynne związki, między innymi serotoninę, histaminę, prostaglandyny, enzymy proteolityczne [14, 17, 22, 23]. Pod wpływem działania określonych czynników fizycznych lub chemicznych komórki tuczne ulegają degranulacji, a zawarte w nich związki uwalniane są do środowiska. W końcowym etapie tego procesu następuje obniżenie się liczby tych komórek w tkankach [20].

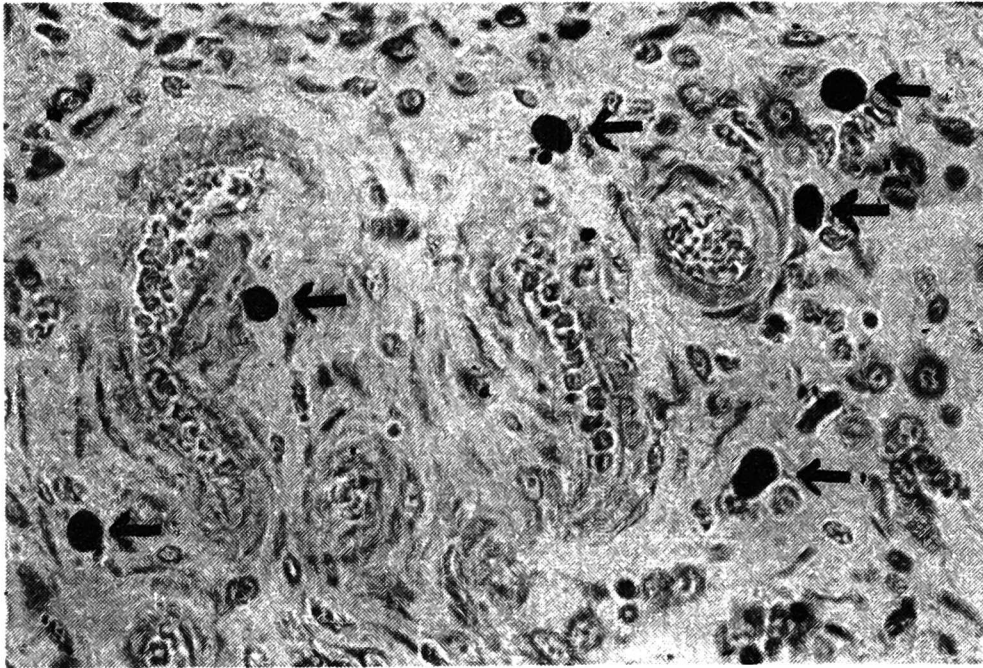
Już wcześniej stwierdzono, że liczba komórek tucznych macicy zmienia się w czasie cyklu płciowego, osiągając najniższe wartości w okresie rui [2, 8, 12, 15]. Przypuszcza się, że spadek ten jest wynikiem degranulacji komórek tucznych, spowodowanej działaniem estrogenów [21]. Obniżenie się liczby komórek tucznych następuje również w czasie implantacji [1, 19]. W tymże okresie decydującą rolę wydają się odgrywać hormony matki, a zwłaszcza tzw. przedimplantacyjne estrogeny [21]. Jednak ilość przedimplantacyjnych estrogenów po początkowym wzroście β -4 dzień ciąży / stabilizuje się i po rozpoczęciu implantacji nie wykazuje już istotnych zmian [16]. Nasuwa się więc pytanie czy zachodzące w tym czasie znikanie komórek tucznych z macicy jest wyłącznie wynikiem stanu hormonalnego samicy, czy biorą też w tym udział implantujące się zarodki. Problemowi temu poświęcono trzy prace własne.

1. NOWA METODA OKREŚLANIA DEGRANULACJI KOMÓREK TUCZNYCH IN VITRO

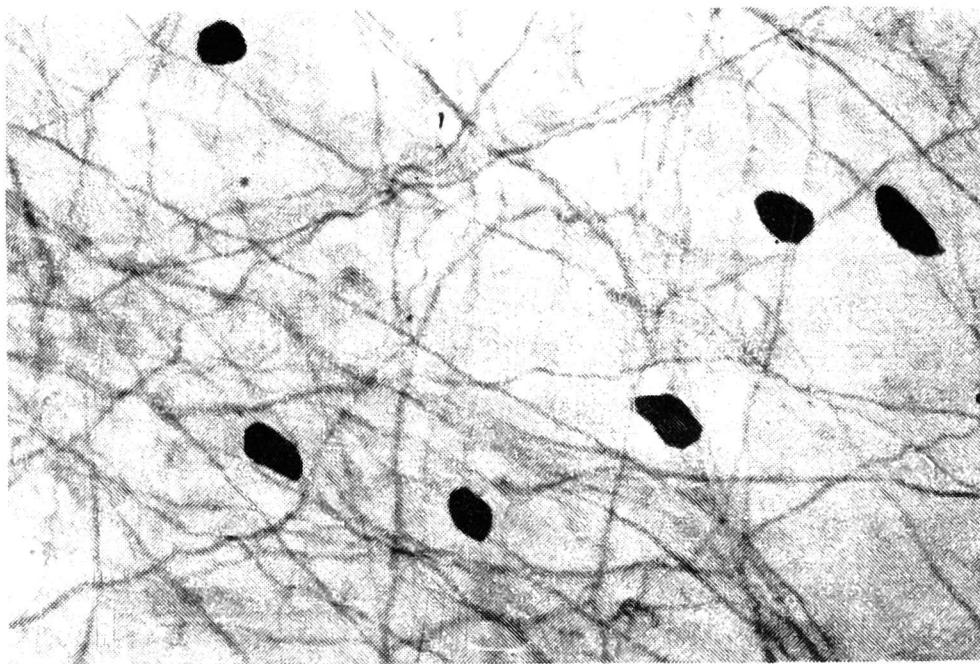
W celu wyjaśnienia czy zarodki biorą aktywny udział w obniżaniu liczby komórek tucznych macicy w okołimplantacyjnym okresie konieczne było opracowanie metody, która umożliwiłaby oznaczenie degranulacyjnej aktywności substancji występujących w małych ilościach lub wykazujących niską aktywność [3]. Opracowana metoda polegała na osadzaniu peritonealnych komórek tucznych na szkiełku podstawowym. Następnie наносzono na nie materiał badany /homogenaty zarodków wyłukanych z macicy, homogenaty zarodków hodowanych in vitro lub pożywkę, w której je hodowano/ lub płyn kontrolny. Po inkubacji osadzone na szkiełku komórki utrwalano i następnie barwiono błękitem toluidyny. Zdegranulowane komórki tuczne liczone pod mikroskopem świetlnym /rys. 3, 4/. Aktywność badanego materiału określano liczbą zdegranulowanych komórek tucznych. Wykorzystując tę metodę oznaczono aktywność przedimplantacyjnych i okołimplantacyjnych zarodków myszy degranulującą komórki tuczne in vitro [4].

2. ZDOLNOŚĆ ZARODKÓW MYSZY DO DEGRANULOWANIA PERITONEALNYCH KOMÓREK TUCZNYCH IN VITRO

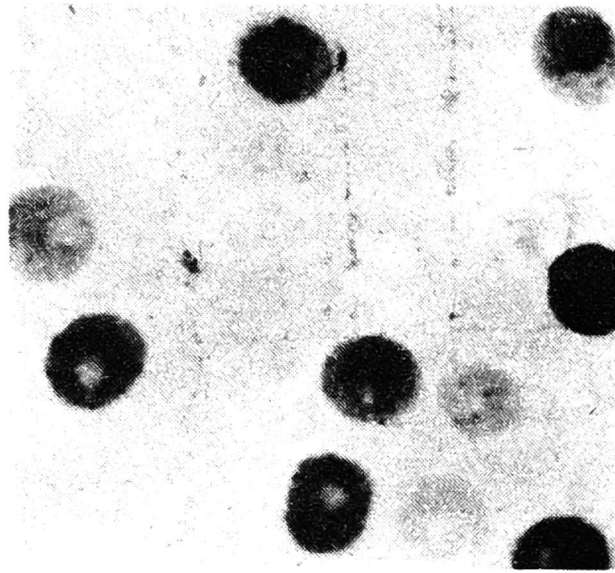
Wyniki doświadczenia wykazały, że zarodki wyłukane z macicy w czwartym lub piątym dniu ciąży wykazują zdolność degranulowania peritonealnych komórek tucznych w warunkach in vitro. Degranulacyjna aktywność wzrasta wraz z wiekiem i stadium rozwoju zarodków. Jest nieobecna u 3-dniowych, pojawia się u 4-dniowych i wzrasta u 5-dniowych zarodków /tab. 1/. Degranulacyjną aktywność wykazują również zarodki hodowane in vitro. W tych warunkach aktywność ta zależy od czasu hodowli, jest większa u zarodków hodowanych w ciągu 48 godzin niż w ciągu 24 godzin. W czasie inkubacji wzrasta również aktywność medium hodowlanego [4], co oznacza, że degranulujący czynnik zarodkowy przenika do środowiska /tab. 2/. Nasuwało to przypuszczenie, że w warunkach fizjologicznych czynnik ten może być uwalniany do



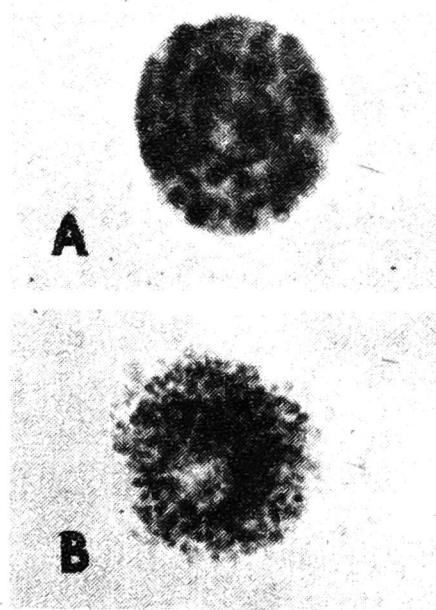
Rys. 1. Przekrój poprzeczny przez macię szczura. Strzałki wskazują komórki tuczne zabarwione błękitem toluidyny /X 170/



Rys. 2. Kreska macicy szczura. Ciemno zabarwione komórki tuczne są rozmieszczone w pobliżu naczyń /X 200/



Rys. 3. Peritonealne komórki tłuszczne osadzone na szkiełku podstawowym /X 500/



Rys. 4. Pojedyncze komórki tłuszczne /X 1200/: A - komórka niezdegranulowana, B - komórka zdegranulowana pod wpływem homogenatów zarodkowych

Tabela 1

Komórki tuczne zdegranulowane przez homogenaty zarodków myszy rozwijających się in vivo

Materiał	Liczba doświadczeń	Liczba zarodków	Średnia \pm SE liczba komórek tucznych zdegranulowanych przez	
			zarodki	płyn kontrolny
3-dniowe zarodki /morule/	10	300	14,5 \pm 1,6 ^x	12,6 \pm 1,2
4-dniowe zarodki /morule i wczesne blastocysty/	9	270	40,0 \pm 2,5 ^{x+}	8,5 \pm 1,1
5-dniowe zarodki /blastocysty w fazie przylegania/	8	240	60,3 \pm 3,1 ⁺	8,4 \pm 0,8

^x $p < 0,01$.⁺ $p < 0,001$.

Tabela 2

Komórki tuczne zdegranulowane przez zarodki myszy rozwijające się in vitro i przez pożywkę hodowlaną

Materiał	Liczba doświadczeń	Liczba zarodków	Średnia \pm SE liczba komórek tucznych zdegranulowanych przez	
			zarodki lub pożywka hodowlana	pożywka kontrolna
3-dniowe zarodki	9	270	40,0 \pm 2,5	8,5 \pm 1,1
4-dniowe zarodki hodowane w ciągu 24 h	8	240	53,7 \pm 2,8 ^x	10,1 \pm 0,7
4-dniowe zarodki hodowane w ciągu 48 h	8	240	70,5 \pm 3,3 ^x	9,0 \pm 0,4
Pożywka hodowlana ⁺	8		49,1 \pm 2,4 ^x	9,1 \pm 0,8
Pożywka hodowlana [‡]	8		64,5 \pm 1,0	8,7 \pm 0,6

⁺ Pożywka Whittena, w której hodowano 4-dniowe zarodki w ciągu 24 godzin.[‡] Wzbogacona pożywka Eagla, w której hodowano zarodki w ciągu następnych 24 godzin.^x $p < 0,01$.

ściany lub światła macicy i zdegranulować jej komórki tuczne. Zależny od zarodków spadek liczby komórek tucznych macicy przypadający raczej na okres poimplantacyjny, gdyż wzrost degranulacyjnej aktywności zarodków zaczyna się w okresie przylegania /5 dzień ciąży/ i zwiększa się istotnie po przeniesieniu zarodków do hodowli. Hipoteza ta wymagała potwierdzenia w warunkach in vivo.

3. ZMIANA LICZBY KOMÓREK TUCZNYCH MACICY SZCZURA PRZED, W CZASIE I PO IMPLANTACJI

Badania przeprowadzono na samicach szczurzych w okresach 24, 12 godzin przed implantacją, w czasie implantacji oraz 12, 24 godziny po implantacji [5]. W tym czasie cytologiczny i histologiczny obraz zarodków i macic przedstawiał się następująco:

24 godziny przed implantacją wyłukane z macicy zarodki są w stadium moruł lub młodych blastocyst z małą jamką. Wszystkie zarodki są w osłonkach przejrzystych. Brak decidualizacji.

12 godzin przed implantacją – wyłukane zarodki są w stadium blastocyst z dużą jamką, a około 75% spośród nich nie posiada otoczek przejrzystych. Brak decidualizacji.

Okres implantacji – wyłukuje się 3-4 zarodki z przylegania, a pozostałe są zaimplantowane. Początek reakcji decidualnej.

12 godzin po implantacji – zarodki wniknęły w głąb śluzówki, powstały krypty zarodkowe, zachowujące jeszcze połączenie ze światłem macicy.

24 godziny po implantacji – zarodki są przesunięte w kierunku antymezometrialnym i otoczone grubą warstwą komórek decidualnych.

Badanym materiałem były macice, które przygotowywano do badań histologicznych metodą rutynową. Komórki tuczne liczono w mikroskopie świetlnym na 6 μm poprzecznych skrawkach, pobranych z miejsc z zaimplantowanym zarodkiem, z miejsc międzyimplantacyjnych lub ze środkowej części rogu w okresie przedimplantacyjnym.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że w ciągu 48 godzin okołoimplantacyjnego okresu nastąpiło istotne zmniejszenie liczby komórek tucznych macicy /tab. 3/. Zmniejszenie to przebiegało w dwu etapach. Pierwszy spadek liczby komórek tucznych objął okres przedimplantacyjny i wczesną fazę implantacji. W tym czasie zapłodnione komórki jajowe przekształciły się w blastocysty, zrzuciły osłonki przejrzyste i część spośród nich przylgnęła do ściany macicy.

Brandon i Bibby [1] wykazały, że w fazie przylegania zmniejszanie liczby komórek tucznych macicy nastąpiło w pobliżu zarodka oraz w miejscach od niego oddalonych /międzyimplantacyjnych/. Sugeruje to, że bodziec powodujący degranulację komórek tucznych był pochodzenia pozazarodkowego. Bodźcem powodującym degranulację w tym okresie mogło być wydzielenie przedimplantacyjnych, macicznych estrogenów. Między 12 i 24 godziną po implantacji nastąpił drugi spadek liczby komórek tucznych, któremu nie towarzyszył już wzrost poziomestrogenów [5]. Nasuwa to przypuszczenie o pojawieniu się nowego czynnika /macicznego lub zarodkowego/, wywierającego wpływ na komórki tuczne macicy. Na rzecz udziału zarodków przemawia fakt, że w tym czasie w tkance macicy, pozostającej z zarodkiem w najbliższym kontakcie, liczba

Zmiana liczby komórek tucznych w macicach szczurów przed, w czasie[†] i po implantacji[†] zarodków

Tabela 3

Okres	Średnia / \pm SE/ liczba komórek tucznych skorygowana przez ${}^{\circ}W_1$	Średnia / \pm SE/ liczba komórek tucznych/mm ²
24 godzin przed implantacją	158,4 \pm 24,5	4,8 \pm 0,4
12 godzin przed implantacją	90,3 \pm 7,7 ^x	2,8 \pm 0,3 ^x
Implantacja	65,8 \pm 13,3 ^x	2,0 \pm 0,4 ^x
12 godzin po implantacji	71,2 \pm 15,4	2,0 \pm 0,4
24 godzin po implantacji	27,5 \pm 5,6 ^x	0,6 \pm 0,1 ^x

^x $P < 0,05$ w stosunku do wartości powyższych.

$${}^{\circ}W_1 = \sqrt{S_x/S_i}$$

S_x = pole powierzchni przekroju w badanych okresach,

S_i = pole powierzchni przekroju w czasie implantacji przyjętej arbitralnie za wzorzec.

[†] Komórki tuczne liczone były w miejscach implantacji.

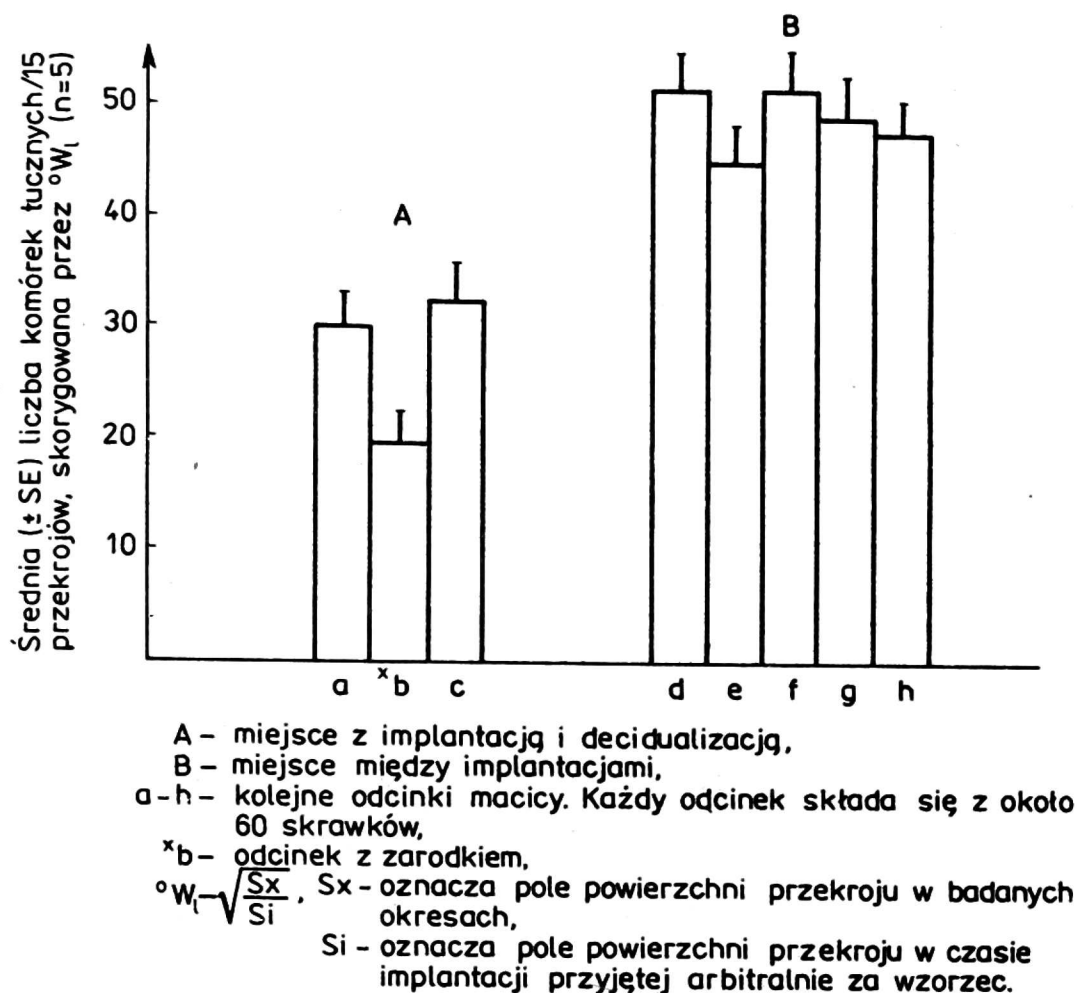
komórek tucznych jest najniższa /rys. 5/. Za tą możliwością przemawiają również wcześniejsze obserwacje uwalniania przez zarodki do środowiska czynnika /czynników/degranulującego peritonealne komórki tuczne in vitro.

Na podstawie przytoczonych faktów i rozważań można przypuszczać, że w warunkach fizjologicznych zachodzi następująca sekwencja zdarzeń:

1. Degranulacyjny czynnik zarodkowy przenika do ściany macicy i degranuluje jej komórki tuczne.
2. W wyniku degranulacji komórek tucznych uwolnione zostają m.in. histamina i prostaglandyny, które biorą udział w transformacji komórek stromy w komórki decidualne.
3. Powstaje coraz rozleglejsza warstwa komórek decidualnych, niezbędnych dla utrzymania ciąży i dalszego rozwoju zarodków.

Opisany mechanizm może być jednym z przejawów współdziałania zachodzącego między zarodkiem a organizmem matki w okołoinplantacyjnym okresie.

Przedstawione wnioski wyciągnięto z doświadczeń wykonanych na dwu gatunkach zwierząt. Degranulacyjną aktywność zarodków oznaczono na myszach, ze względu na dużą podatność tych zwierząt na hormonalną stymulację owulacji. Umożliwiło to uzyskanie dużej ilości zarodków. Natomiast zależny od tej aktywności spadek liczby komórek tucznych macicy zbadano na



Rys. 5. Liczba komórek tłuszczowych macicy szczura w miejscach z zainplantowanym zarodkiem oraz między tymi miejscami

szczurach, ponieważ w macicy tych zwierząt występuje znacznie więcej komórek tłuszczowych niż w macicach myszy. W doświadczeniach pilotażowych stwierdzono, że również zarodki szczurów degranulują peritonealne komórki tłuszczowe *in vitro*. Upoważnia to do przedstawienia wniosków i uogólnień opartych na wynikach uzyskanych z różnych doświadczeń.

Komórki tłuszczowe występują także w narządach rodnych zwierząt hodowlanych, a zmiany liczby komórek tłuszczowych w czasie cyklu płciowego u krów i owiec są podobne do zmian zachodzących w narządach rodnych myszy i szczura [20]. Można więc przypuszczać, że wyniki doświadczeń, przeprowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych, są reprezentatywne również dla zwierząt hodowlanych.

LITERATURA

1. Brandon J.K., Bibby M.C.: A study of changes in uterine mast cells during early pregnancy in the rat. *Biol. Reprod.* 1979, 20, 977-980.
2. Brandon J.M., Evans J.E.: Changes in uterine mast cells during the estrous cycle in the syrian hamster. *Am. J. Anat.* 1983, 167, 241-247..

3. Choroszeńska A., Mańkowska E.: New method for determination of mast cells degranulation in vitro. *Archv. Immun. Ther. exp.* 1983, 31, 625-630.
4. Choroszeńska A., Mańkowska E.: Ability of mouse embryos to degranulate mast cells in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1985, 75, 95-99.
5. Choroszeńska A., Mańkowska E., Strojny P.: Embryo-related uterine mast cells reduction. Przygotowane do druku w *J. Reprod. Fert.*
6. De Feo V.J.: Decidualization in R.M. Wynn: Cellular biology of the uterus. Appleton-Century-Crofts-New York 1967, 191-290.
7. Glasser S.R.: The uterine environment in implantation and decidualization, w Balin H., Glasser S. *Reproductive Biology. Excerpta Medica-Amsterdam* 1972, 776-833.
8. Harvey E.B.: Mast cells distribution in the uterus of cycling and pregnant hamster. *Anat. Rec.* 1964, 148, 507-515.
9. Johnson D.C., Dey S.K.: Role of histamine in implantation: dexamethasone inhibits estradiol induced implantation in the rat. *Biol. Reprod.* 1980, 22, 1136-1141.
10. Kennedy T.G.: Evidence for a role for prostaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat. *Biol. Reprod.* 1977, 16, 286-291.
11. Kennedy T.G., Lukash L.A.: Induction of decidualization in rats by the intrauterine infusion of prostaglandins. *Biol. Reprod.* 1982, 27, 253-260.
12. Lau J.F., Saksena S.K., Chang M.C.: Pregnancy blockade by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis: its reversal by prostaglandins. *Prostaglandins* 1973, 4, 795-803.
13. Le Vier R.R., Spaziani E.: The effects of estradiol on the occurrence of mast cells in the rat uterus. *Expl Cell Res.* 1966, 41, 244-252.
14. Lewis R.A., Soter N.A., Diamond P.T., Austen K.F., Oates J.A., Roberts L.J., II.: Prostaglandin D₂ generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE. *J. Immunol.* 1982, 129, 1627-1631.
15. Maraspin L.E., Bo W.K.: Effects of hormones, pregnancy and pseudopregnancy on the mast cell count in the rat uterus. *Life Sciences* 1971, 10, 111-120.
16. Nimrod A., Ladany S., Linder H.R.: Prenidatory ovarian oestrogen secretion in the pregnant rat, determined by gas chromatography with electron capture detection. *J. Endocr.* 1972, 53, 249-260.
17. Okuno-Kaneda S., Saito T., Kawasaki Y., Ichikawa A., Tomita K.: Properties of protease in mast cell granules. *Bioch. Pharmacol.* 1980, 29, 1715-1722.
18. Shelesnyak M.C.: Some experimental studies on the mechanism of ova-implantation in the rat. *Recent Progr. Horn. Res.* 1957, 8, 269-322.

19. Shelesnyak M.C.: Nidation of the fertilized ovum. *Endeavour*. 1960, 19, 81-86.
20. Selye H.: *The Mast Cells*. Butterworths-Washington, 1965.
21. Spaziani E.: Accessory reproductive organs in mammals: control of cell and tissue transport by sex hormones. *Pharmacol. Rev.* 1975, 27, 207-286.
22. Theoharides T.C., Bondy P.K., Tsakalos N.D., Askenase T.P.: Differential release of serotonin and histamine from mast cells. *Nature*, 1982, 297, 229-231.
23. Uvnas B.: Histamine storage and release. *Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol.* 1974, 33, 2172-2186.

A. Choroszevska

ABILITY OF EMBRYOS TO DEGRANULATE UTERINE MAST CELLS
AND POSSIBLE ROLE OF THIS PROCESS IN THE EMBRYO-MATERNAL INTERACTION
DURING IMPLANTATION

Summary

Mouse embryos flushed from the reproductive tract on Day 4 or 5 post coitum degranulated peritoneal mast cells in vitro. The degranulating activity of embryos developed with age of embryos: it was absent with Day-3 embryos, present with Day-4 embryos and was increased with Day-5 embryos. Day-4 embryos cultured for 24 h also exhibited degranulating activity. Such activity was even greater for embryos cultured for 48 h. As the degranulating activity of the incubated embryos increased, it was accompanied by an increase in the degranulating activity of the culture medium.

It is also possible, that degranulating embryo factor affects also uterine mast cells. It was established that during the 48 hours of periimplantation period their number in rat uterus gets decreased. The decrease occurs in two stages. The first drop in the number occurs in preimplantation period and the early implantation phase and probably results from preimplantation secretion of estrogens. The other fall of the number of uterine mast cells is observed 24 hours after implantation, probably as a result of release of degranulating embryo factor.

А. Хорошевска

СПОСОБНОСТЬ ЗАРОДЫШЕЙ ДЕГРАНУЛИРОВАНИЯ ЖИРОВЫХ КЛЕТОК МАТКИ
И ПРЕДПОЛОЖИТЕЛЬНАЯ РОЛЬ ЭТОГО ПРОЦЕССА
В МАТЕРИНСКО-ЗАРОДЫШЕВОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ В ПЕРИОД ИМПЛАНТАЦИИ

Р е з ю м е

Зародыши мышей, выполосканные из родильного органа на 4-й или 5-й день беременности, дегранулируют перителлиальные жировые клетки *in vitro*. Дегрануляционная активность зародышей зависит от их возраста: не выступает у трехдневных, появляется у четырехдневных и повышается у пятидневных зародышей. Подобная зависимость установлена также у развивающихся *in vitro* зародышей: выше в случае культуры четырехдневных зародышей в течение 48 часов, чем в течение 24 часов. По мере роста дегрануляционной активности инкубированных зародышей, повышается активность культурной питательной среды.

Таким образом можно предполагать, что дегрануляционный зародышевый фактор оказывает влияние также на жировые клетки матки. Установлено, что в течение околомплантационного периода происходит снижение их числа в матке крыс. Это снижение происходит в двух этапах. Первое снижение имеет место в предимплантационный период и в ранней фазе имплантации, предположительно в связи с выделением предимплантационных эстрогенов. Второе снижение числа жировых клеток матки происходит между 12 и 24 часом после имплантации в связи с выделением дегранулирующего зародышевого фактора.