

Молекулы клеточной адгезии и их роль в имплантации

Имплантация эмбриона-сложный процесс, включающий взаимодействия между материнскими и эмбриональными клетками. Представлен краткий обзор молекул клеточной адгезии, обсуждена их роль во взаимоотношениях между клетками трофобласта с эпителием эндометрия.

Ключевые слова: трофобласт, эндометрий, имплантация эмбриона человека, адгезионные молекулы, кадгерины, интегрины, селектины.

Молекулы клеточной адгезии (МКА) – сложные трансмембранные белки, обеспечивающие взаимодействие клеток с соседними клетками или элементами межклеточного матрикса. С помощью рецепторов МКА клетка получает информацию о своем пространственном положении. Тесная связь рецепторов клеточной мембраны с прилежащими к ней элементами цитоскелета обеспечивает изменение формы клетки, ее перемещение. Кроме того, цитоскелет связан с вторичными посредниками или с белками ядерного матрикса. Поэтому сигнал с рецепторов клеточной мембраны, в конечном счете, может изменить функционирование клетки либо через систему вторичных посредников, либо посредством изменения экспрессии генов. Последнее, в свою очередь, может привести к изменению набора МКА на поверхности клеток, что обеспечивает появление возможностей к принятию новых сигналов, миграции вдоль новых субстратов межклеточного матрикса и пр. (1).

Т.о. экспрессия МКА опосредует связь между одномерным генетическим кодом и трехмерным организмом. Установлено, что временное и пространственное изменение МКА является решающим фактором в дифференцировке и группировке клеток, ассоциации и диссоциации с другими клетками, происходящих на протяжении всего периода эмбриогенеза, а также в ходе воспалительных реакций, восстановлении ткани после повреждения, опухолевого роста и многих других процессов.

В настоящее время (1) выделяют следующие группы МКА:

1. Кадгерины – Ca^{2+} -зависимые МКА, объединяют клетки в ткани и поддерживают целостность ткани. Для кадгеринов характерны гомофильные взаимодействия (когда рецептор и лиганд идентичны), т.е. внеклеточные участки кадгериновых молекул двух соседних клеток объединяются друг с другом.

2. Селектины – группа МКА, которые связываются с углеводными остатками в составе гликопротеинов на поверхности соседних клеток.

3. Интегрины – это обширная группа МКА, которые участвуют не только в межклеточных взаимодействиях, но и во взаимодействиях с компонентами внеклеточного матрикса. Семейство интегринов делят на подсемейства по типу ?-цепи. В организме человека наиболее часто определяются ?1-, ?2- и ?3-цепи. Лигандами ?1-цепей являются ламинин, коллаген, фибронектин, ?3-цепи взаимодействуют с фибриногеном, витронектином, тромбоспондином, т.е. эти интегрины обеспечивают адгезию клеток к элементам межклеточного матрикса. Лигандами для ?2-цепей будут являться другие виды МКА, часто – иммуноглобулинового семейства, они участвуют, в основном, в межклеточных взаимодействиях. Каждая ?-цепь может связываться с одной из различных ?-цепей, в

результате чего образуются разнообразные молекулы адгезии внутри каждого подсемейства.

4. Иммуноглобулиновое суперсемейство – это группа МКА, структура внеклеточной части которых напоминает структуру молекул иммуноглобулинов. Все МКА, принадлежащие этому суперсемейству, делятся на две группы: образующие гомофильные и гетерофильные (например, с интегринами) связи.

5. Муцины (протеогликаны) – это МКА, имеющие ряд гликозаминогликановых участков связывания, например, для контакта с гиалуроновой кислотой аморфного вещества.

В процессе эмбриогенеза при формировании из одноклеточной зиготы многоклеточного организма структурами, обеспечивающими соединение клеток и межклеточный обмен информацией, а также опосредующими морфогенетические изменения, являются, главным образом, МКА. Модулируя появление этих молекул, геном развивающегося организма детерминирует процесс морфогенеза. Именно поэтому МКА активно участвуют на всех этапах эмбрионального развития, начиная от формирования гамет и заканчивая рождением.

На мембране зрелых овулировавших овоцитов с помощью различных методов исследования (иммуноблоттинг, иммуноцитохимия и пр.) обнаружено (5) несколько классов МКА: интегрины, кадгеринины (E-, P-, N-), селектины (L-) и иммуноглобулиновые (N-CAM) МКА. Очевидно, часть из них принимает участие в контакте со сперматозоидом, часть необходима для дальнейшего развития зиготы и бластулы, для обеспечения процессов компактизации и имплантации. Поскольку в процессе оплодотворения сперматозоид не вносит участок мембраны, то рецепторный набор на поверхности зиготы практически не отличается от такового у овоцита.

В дальнейшем, в процессе дробления происходит увеличение числа бластомеров, а значит, синтез и сборка новых участков клеточных мембран. В это время белковый синтез идет с мРНК материнского происхождения, которые запасались в периоде большого роста овоцита. Отцовский геном пока не активен, хотя транскрипты обнаруживаются на стадии позднего пронуклеуса. Активация генома концептуса (транскрипция РНК с ДНК и материнского, и отцовского происхождения) начинается на 4-8 клеточной стадии. В процессе цитотомии и формирования новой мембраны бластомеры остаются неплотно связаны друг с другом, контактируют лишь незначительными участками, как любые сгруппированные вместе шарообразные структуры. В это время происходит процесс поляризации – перемещение определенных мембранных белков в определенные участки мембраны. Поляризация является подготовкой к компактизации (1).

На стадии 8-10 (по некоторым данным у человека – 16) бластомеров площадь контакта между ними увеличивается за счет встраивания новых субъединиц плазматической мембраны (появление новых МКА), бластомеры теряют правильную шарообразную форму (реорганизация цитоскелета), плотно прилегают друг к другу всей поверхностью мембраны: происходит компактизация. Формируется морфофункциональное несходство наружной поверхности («старой» мембраны, унаследованной от зиготы) и внутренних контактных поверхностей. Компактизация устанавливает полярность клеток, и последующие клеточные деления приводят к формированию двух клеточных линий: трофобласта – поверхностных клеток и эмбриобласта – внутренней клеточной массы. В ходе дробления гетерогенность клеточных поверхностей усиливается, появляются специальные контактные зоны с

особой локальной организацией поверхности и цитоскелета. Эти новые контактные зоны играют большую роль в межклеточных взаимодействиях: они способствуют прохождению электрических потенциалов, мелких молекул, а также несут для каждого бластомера позиционную информацию обо всей системе. Процессы, связанные с межклеточными взаимодействиями имеют большое значение для определения дальнейшей судьбы бластомеров: после того, как в ходе компактизации клетки занимают положение на поверхности или внутри зародыша, они начинают различаться по многим свойствам, и ни трофобласт, ни эмбриобласт не обмениваются клетками друг с другом (1).

Клетки эмбриобласта формируют плотные и щелевые контакты, в формировании которых принимают участие, главным образом, кадгеринины (например, увоморулин или L-МКА или E-кадгерин) и МКА иммуноглобулинового семейства (в основном, N-CAM). Посредством этих контактов клетки прилипают друг к другу и обмениваются малыми молекулами и ионами.

Клетки трофобласта соединены плотными контактами, обеспечивающими изоляцию эмбриобласта. Основная часть этих белков – кадгеринины, основным из которых является E-кадгерин. Он играет большую роль в раннем развитии, т.к. трансгенные мыши, не имеющие гена к этому белку, не формируют трофобласта и не имплантируются. Вместе с кадгеринами в базолатеральные поверхности клеток встраиваются цингулин, окклюдин, Na-K-АТФ-аза, что обеспечивает транспорт жидкости внутрь бластулы и образование полости. В ходе кавитации (32-клеточная стадия) в результате последовательной экспрессии десмоплакинов, десмоглеинов и десмоколлинов (десмосомальные кадгеринины) формируются полноценные десмосомы (5). Вместе с тем, для дальнейшего развития концептуса становятся важны те МКА, которые формируются на наружной поверхности клеток трофобласта и обеспечивают связь с материнским организмом.

Имплантация бластоцисты в стенку матки происходит на 5-6-е сутки после оплодотворения, что соответствует 20-21 дню менструального цикла. Для того, чтобы имплантация состоялась, необходимо три обязательных условия: достаточный уровень половых гормонов (прогестерона), готовность стенки матки и зрелость трофобласта.

20-21 день менструального цикла соответствует секреторной фазе. В это время под влиянием секретруемого желтым телом прогестерона происходят изменения в эпителиальном и соединительнотканном слоях эндометрия. Наблюдается гипертрофия эпителиоцитов, расширение и разветвление маточных желез, секреция ими гликогена, гликопротеинов, липидов, муцина и выделение секрета в просвет матки. Количество соединительнотканнных клеток увеличивается, в их цитоплазме накапливается гликоген и липиды – формируются децидуальные клетки. Спиральные артерии приобретают более извитой характер, приближаются к поверхности слизистой. Все это создает благоприятные условия для имплантации и питания бластоцисты.

В течение всего менструального цикла поверхностный и железистый эпителий и стромальные клетки эндометрия экспрессируют на своей поверхности чрезвычайно сложный, постоянно изменяющийся репертуар МКА. Промежуток времени, в течение которого может произойти имплантация, определяется наличием необходимых рецепторов на поверхности клеток эндометрия и получает название фазы восприимчивости эндометрия (*window of implantation, uterine receptivity* в англоязычной литературе). Основным фактором, отвечающим за экспрессию МКА на

поверхности клеток эндометрия, являются стероидные гормоны (прогестерон). Прогестерон также ответственен за секрецию клетками стромы в межклеточное вещество некоторых лигандов для МКА (остеопонтин)(10).

Кроме стероидных гормонов за экспрессию МКА на поверхности клеток эндометрия отвечают некоторые факторы роста, например, ЭФР, цитокины, другие паракринные влияния(8). Кроме того, сам концептус способен модулировать молекулярный состав на поверхности клеток эндометрия, посредством своих хемокинов в стадии противостояния и адгезии.

Таким образом, эндометрий не является пассивной тканью, которая лишь подвергается действию протеолитических ферментов трофобласта. Показано, что низкий уровень прогестерона либо снижение количества прогестероновых рецепторов снижает количество необходимых МКА (6). Цитокины, находящиеся в эндометрии при воспалительных процессах, нарушают нормальное распределение МКА, что также затрудняет имплантацию (6).

В ходе имплантации трофобласт достигает определенной стадии дифференцировки и разделяется на два слоя: внутренний цито- и наружный синцитиотрофобласт. Цитотрофобласт (ЦТБ, слой Лангханса) состоит из активно размножающихся клеток. При слиянии клеток ЦТБ образуется синцитиотрофобласт (СТБ). СТБ – непрерывный слой многоядерной цитоплазмы, в которой располагаются как органеллы синтеза (в базальной части, прилежащей к ЦТБ), так и большое количество пузырьков и везикул (в поверхностном слое). На наружной поверхности СТБ образует множество микроворсинок, посредством которых происходит взаимодействие с эндометрием. Органеллы синтеза используются для продукции протеолитических ферментов, необходимых для инвазии в стенку матки, и многих биологически активных веществ. Еще один компонент трофобласта – вневорсинчатый цитотрофобласт (ввЦТБ), который участвует в эпителио-соединительнотканых взаимодействиях и формируется позже, в ходе прикрепления ворсин к соединительнотканной строме эндометрия. В месте прикрепления («заякоривания») ворсин он образует многослойные клеточные колонны, покрывает соединительнотканые перегородки плаценты, инфильтрирует децидуальную строму и сосуды. И ЦТБ, и СТБ обладают чертами эпителиальной ткани, в то время как ввЦТБ теряет одни молекулярные черты эпителия (отсутствует E-кадгерин, интегрин β_6/β_4), но сохраняет другие (присутствуют другие цитокератины).

Имплантацию условно делят на три периода: противостояния (apposition), прикрепление или прилипание (attachment, adhesion) и внедрение (invasion).

В ходе противостояния бластоциста некоторое время находится во взвешенном состоянии у места будущей имплантации. Очевидно, в это время происходит «проверка» готовности трофобласта и эпителия матки: обмен сигнальными молекулами. Среди них основное значение придают интерферону, интерлейкину, факторам роста – подробно обсуждается в литературе роль интерферона-1, интерлейкина-6 или LIF, инсулиноподобного ФР IGF, трансформирующего ФР TGF- β , эпидермального ФР EGF. Рецепторы к этим цитокинам обнаружены на поверхности трофобласта, и они обеспечивают нормальное протекание имплантации благодаря митогенным, дифференцирующим, антиапоптотическим свойствам, активным пара- и аутокринным влияниям. В свою очередь и трофобласт выделяет сигнальные молекулы, в основном, EGF и интерлейкин IL-1, рецепторы к которым – интегрин $\alpha_3\beta_1$ обнаруживаются на поверхности эпителия (8).

Во второй фазе имплантации начинается дифференцировка трофобласта на два слоя: ЦТБ и СТБ, поэтому начало адгезии опосредуется МКА на поверхности только ЦТБ, а в дальнейшем мембрана, несущая эти МКА, становится частью СТБ. Итак, при адгезии ЦТБ прикрепляется к поверхностным эпителиальным клеткам эндометрия. В процессе прилипания большую роль играют гомофильные взаимодействия между поверхностными, а затем железистыми клетками эндометрия и трофобластом, опосредуемые кадгеринами. Наибольшее значение имеют E-кадгерин и кадгерин-11 и -6. Экспрессия E-кадгерина определяется на стадии овоцита, пронуклеуса, дробления, выявлена и на поверхности бластоцисты. Очевидно, именно этот кадгерин обеспечивает прикрепление трофобласта, а для инвазии экспрессируются еще кадгерин-11 и -6. Вместе с E-кадгерином они обнаруживаются на железистых эпителиоцитах и стромальных клетках эндометрия, а также на поверхности СТБ и ввЦТБ, особенно в области колонн, т.е. участвуют в инфильтрации трофобластом соединительнотканной стромы и прикреплении ворсинок хориона к эндометрию (4,11). Предполагается, что экспрессия E-кадгерина на соседних поверхностях приводит к ингибированию подвижности и инвазии трофобласта вглубь эндометрия (6).

Подобные гомофильные взаимодействия между трофобластом и эндометрием опосредует группа белков, которые практически не обнаруживаются ни в каких других клетках организма, за исключением макрофагов (непостоянно). Это мембранный белок трофинин и связанные с ним цитоплазматические белки тастин и бистин, ассоциированные с цитоскелетом. Эпителием эндометрия трофинин экспрессируется очень непродолжительный период времени, а именно – в течение фазы восприимчивости. Если беременность не наступает, в позднюю секреторную фазу он не обнаруживается. Это не только поверхностный белок, но и продукт секреции желез. Трофинин, тастин и бистин выявляются в преимплантационном трофобласте. Вместе с тем, все эти молекулы исчезают с поверхности плаценты во втором триместре (9).

Селектины не очень широко представлены на поверхности трофобласта, очевидно. эта группа МКА не играет большого значения в развитии раннего эмбриона. Четко выявлена экспрессия лишь L-селектина, а на поверхности эпителия матки – селективные олигосахаридные лиганды. С другой стороны, E- и P-селектины экспрессируются эндотелием сосудов базальной децидуальной оболочки и играют роль в инвазии ввЦТБ в спиральные артерии (7).

Интегрины – наиболее широко изученная группа МКА. Овоцит, зигота, бластула, предимплантационный эмбрион человека экспрессирует на своей поверхности целый ансамбль интегриновых субъединиц: ?3, ?v, ?1, ?3, ?4, ?5, который изменяется в ходе дробления. К началу имплантации на поверхности трофобласта выявляются ?3 ?1, ?3(или ?6) ?4, ?v ?3, ?v ?5.

На поверхности эпителия матки постоянно определяются следующие интегриновые субъединицы: ?2, ?3, ?6, ?1, ?4, ?5 (5). Появление остальных субъединиц регулируется в течение цикла: на поверхности железистого эпителия ?v, ?1, ?9 повышается после овуляции, но ?1 снижается в позднюю секреторную фазу. ?3 на поверхности железистого эпителия появляется на 19 сутки цикла, а ?6 – в течение секреторной фазы. Таким образом, ко времени имплантации на поверхности эпителия определяются ?2 ?1, ?3 ?1, ?9 ?1, ?6 ?4, ?v ?3, ?v ?5, ?v ?6. ?6 ?4 присутствует на

базальной поверхности эпителиоцитов, а $\alpha 2 \beta 1$ и $\alpha 3 \beta 1$ – на латеральной, $\alpha v \beta 5$ – на апикальной.

Известно, что интегрины не связываются друг с другом, т.е. не образуют гомофильных связей. В процессе имплантации интегриновые молекулы прикрепляются друг к другу с помощью лигандов-мостиков, связывающих рецепторы на эмбриональной и материнской поверхностях. Возможными лигандами являются: фибронектин, остеопонтин, коллаген, витронетин, тромбоспондин, перлекан (протеогликан гепаран сульфат) и др. белки межклеточного матрикса, имеющие в своей структуре RGD-последовательность (Arg-Gly-Asp), с которой и взаимодействуют многие интегрины (4).

Связывающий компонент может иметь и материнское, и эмбриональное происхождение. Так, остеопонтин секретируется эпителиальными клетками, локализуется у апикальной поверхности в секреторную фазу, тромбоспондин является продуктом секреции маточных желез и децидуальных клеток. Накануне имплантации разрушается оболочка оплодотворения, окружающая бластулу, но в ее составе выявляются фибронектин, гепаран сульфат, ламинин, которые также могут служить лигандом-мостиком между интегриновыми молекулами в ходе прикрепления трофобласта к эпителию матки.

В дальнейшем трофобласт раздвигает эпителиальные клетки и контактирует с базальной мембраной. К этому времени формируются ферментные системы трофобласта и начинается инвазия, в ходе которой происходит взаимодействие с элементами межклеточного матрикса и изменение интегринового рисунка на поверхности СТБ. Так, при достижении базальной мембраны эпителия матки трофобласт экспрессирует интегрины $\alpha 6 \beta 4$, которые закрепляют его у ламинина базальной мембраны и индуцируют секрецию разрушающих ее ферментов. После этого достигается контакт со стромой эндометрия; при этом экспрессируются другие интегрины (в основном, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$), которые закрепляют трофобласт уже в строме эндометрия у белков остеопонтина, тромбоспондина и пр. и индуцируют секрецию других ферментов, разрушающих соединительнотканную строму и т.о. обеспечивающих дальнейшее проникновение в эндометрий (8).

При формировании ворсин клетки ЦТБ экспрессируют $\alpha 6 \beta 4$ интегрины, обеспечивающие связь клеток с собственной базальной мембраной. Клетки ввЦТБ, посредством колонн связывающие ворсинки со децидуальной оболочкой, экспрессируют $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 1 \beta 1$ интегрины, формирующие прочные связи с фибронектином и ламинином межклеточного вещества соответственно.

Интегрины обеспечивают взаимодействие не только с элементами межклеточного матрикса, но и с МКА на других клетках. Рецепторами интегринов в этом случае являются МКА иммуноглобулинового семейства: ICAM (intercellular adhesion molecula), VCAM (vascular cellular adhesion molecula), PECAM (platelet-endotelial cell adhesion molecula). Эти молекулы экспрессируются эндотелием сосудов (2).

В процессе имплантации и плацентации материнские спиральные артерии подвергаются инвазии ввЦТБ, клетки которого мигрируют вдоль поверхности эндотелиоцитов, внедряются вглубь стенки артерии, разрушают мышечные и эластические элементы сосудистой стенки. Замещение разрушенных элементов стенки сосуда фибриноидом позволяет существенно увеличить поток крови в межворсинчатое пространство и сделать этот поток независимым от вазоконстрикции. Этот процесс регулируется гетерофильными межклеточными связями. Так, ICAM-1

экспрессируется эндотелием сосудов в любом участке децидуальной оболочки, VCAM-1 и PECAM-1 – в основном, в месте имплантации, их экспрессия не обнаруживается в париетальной децидуальной оболочке. β 2-интегрины ввЦТБ взаимодействуют с этими молекулами при инвазии в просвет спиральных артерий (4).

МКА иммуноглобулинового семейства обеспечивают также и гомофильные взаимодействия. Обнаружена экспрессия N-CAM ввЦТБ и эндотелием сосудов(39). Эти данные также подтверждают, что сосудистая инвазия трофобласта регулируется, а, возможно, и ингибируется комплексом интегриновых и иммуноглобулиновых МКА (4).

Из муцинов – последняя из названных нами групп МКА – на поверхности трофобласта выявляется CD44. Эта молекула может связываться с гиалуроновой кислотой, сульфатированными и сиаловыми олигосахаридами, которые в большом количестве присутствуют на поверхности эпителиоцитов эндометрия и могут являться ее лигандами. CD44 связывает остеопонтин, а значит, может опосредовать связь с интегринными клетками эндометрия. С другой стороны, CD44 экспрессируется также эпителием эндометрия и клетками стромы в течение всего цикла и при беременности, а значит, может опосредовать связь с трофобластом (10).

В литературе имеются сведения о некоторых естественных антиадгезионных механизмах (4). Так, при прикреплении к эпителиальной поверхности эмбрион сталкивается с гликокаликсом. Компонентом этого слоя является MUC-1- мембран-ассоциированный муцин. Он присутствует на МВ и ресничках поверхностного эпителия эндометрия. MUC-1 экспрессируется и в секреторную, и в пролиферативную фазы цикла, но значительно больше в секреторную фазу и на поверхности клеток, и в секрете. Максимальная концентрация его наблюдается с 21 до 27 день цикла.

Функция секреторной формы MUC-1 неизвестна. Совместно с другими муцинами он может играть роль барьера, например, для микроорганизмов, может быть компонентом жидкого окружения имплантирующегося эмбриона. В высокой концентрации MUC-1 ингибирует клеточную адгезию, а значит, взаимодействие эмбриона с адгезионными молекулами, присутствующими на материнском апикальном эпителии при имплантации.

MUC-1 может регулировать начало «окна имплантации», быть ответственным за последующее снижение чувствительности матки. Правда, у человека в течение 1 недели после овуляции концентрация MUC-1 высока; видимо, небольшая область низкой экспрессии может определять место имплантации. Возможно, MUC-1 несет гликаны, узнаваемые эмбрионом. Т.о. avidность трофобласт-эпителиальных взаимоотношений может быть уменьшена присутствием MUC-1, т.о. обеспечивая прилипание после миграции эмбриона вдоль эпителиального пласта.

Таким образом, имплантация – высоко скоординированное событие, требующее подготовки и трофобласта, и эндометрия. В течение менструального цикла эндометрий экспрессирует на своей поверхности чрезвычайно сложный, постоянно изменяющийся репертуар белков. Нарушения нормального распределения МКА ответственны за нарушение имплантации. Изучение мембранных белков и использование их как биомаркеров помогает идентифицировать среди нефертильных женщин, тех, у которых нарушена имплантация. Хотя изучение МКА клеток эндометрия и бластоцисты человека еще только начинается, эта область знаний быстро развивается, и, несомненно, увеличит возможности в диагностике и лечении

бесплодия (4,6,9) и открывает перспективы для разработки новых методов контрацепции.(7,8).

Литература

1. Гилберт С. Биология развития. М. «Мир», 1995, т.3. 352с.
2. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М., «Мир», 2000, 581с.
3. Фаллер Д.М.,Шилдс Д. Молекулярная биология клетки. М.«Бином»,2003, 268с.
4. Aplin J.D. Adhesion molecules in implantation. Rev.Reprod. 1997, 2, 84-93.
5. Bloor D.J., Metcalfe A.D., Rutherford A. Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. Mol.Hum.Reprod.2002, Vol.8, N3, 237-45
6. Cavagna M., Mantese J.C. Biomarkers of endometrial receptivity. Placenta, 2003, Oct;24 Suppl:39-47.
7. Genbacev O.D., Prakobphol A., Foulk R.A. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. Science, 2003, Jan, 17;299:405-8.
8. Lessey B.A. Adhesion molecules and implantation. J.Reprod.Immunol. 2002, May-Jun; 55(1-2): 101-112.
9. Nakayama J., Aoki D., Suga T., Akama T.O. Implantation-dependent expression of trophinin by maternal fallopian tube epithelia. Am.J.Pathol. 2003, Dec.;163(6):2211-9.
10. Skrzypczak J., Mikolajczyk M., Szymanowski K. Endometrial receptivity. Reprod.Biol. 2001, Nov; 1(2):85-94.
11. Thomas K., Thomson A., Wood S., Kingsland C. Endometrial integrin expression in women undergoing in vitro fertilization and the association with subsequent treatment outcome. Fertil Steril. 2005 Sep;80(3):502-7