

ГИНЕКОЛОГИЯ

ОСОБЕННОСТИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ В НОРМЕ И ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ГИНЕКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Т.А. Аникина, В.Е. Радзинский

Кафедра акушерства и гинекологии с курсом перинатологии
Медицинский факультет
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Макля, 8, Москва, Россия, 117198

К.А. Рубина, В.Ю. Сысоева

Факультет фундаментальной медицины
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ломоносовский проспект, 31, корп. 5, Москва, Россия, 119192

В ходе настоящего экспериментального исследования впервые неферментативным путем выделены и культивированы стромальные клетки нормального эндометрия и эндометрия при аденомиозе, миоме матки и гиперпластических процессах эндометрия. Охарактеризованы свойства эндометриальных стромальных клеток, и представлены сравнительные данные по экспрессии ими поверхностных маркеров, характерных для фенотипа мезенхимальных стромальных клеток.

Ключевые слова: эндометрий человека, мезенхимальные стромальные (стволовые) клетки, поверхностные клеточные маркеры

Быстрое развитие регенеративной медицины актуализирует проблему участия стволовых клеток в возникновении и развитии пролиферативных заболеваний эндометрия. Недавние исследования свидетельствуют о том, что стволовые клетки являются ресурсом, благодаря которому происходят физиологические преобразования в эндометрии [10, 11, 20]. Предполагается, что взрослые прогениторные/стволовые клетки ответственны за регенеративную способность человеческого эндометрия, а их дисфункция может приводить к пролиферативным нарушениям в эндометрии и, как следствие, к гинекологическим заболеваниям [4, 11, 12]. На сегодняшний день разные ученые, в зависимости от различных экспериментальных подходов, описывают несколько популяций стволовых/прогениторных клеток в эндометрии: эпителиальных и стромальных SP-клеток, имеющих черты стволовых; эндометриальных регенеративных клеток («Endometrial regenerative cells»); мезенхимальных стромальных клеток (МСК), выделенных из менструальной крови [2, 3, 14, 15, 17, 18]. Существует большое количество вопросов, связанных со специфическими свойствами этих клеток, их фенотипическими особенностями, взаимодей-

ствием с окружающей нишей, которые обеспечивают их функционирование в нормальной и патологически измененной ткани [11].

В настоящем исследовании впервые продемонстрирован наиболее простой, не требующий ферментативной обработки, метод выделения популяции МСК из эндометриальной ткани. Впервые проводится сравнительная характеристика МСК нормального неизмененного эндометрия и эндометрия при таких заболеваниях, как гиперпластические процессы эндометрия (ГПЭ), аденомиоз (АМ), миома матки (ММ), с целью выявления характерных особенностей МСК эндометрия и возможных фенотипических и различий между ними.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе лаборатории кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, гинекологических отделений ГКБ № 12 и ГКБ № 64. Были обследованы 110 пациенток репродуктивного возраста, у которых при отдельном диагностическом выскабливании слизистой матки и аспирационной биопсии эндометрия получены образцы эндометриальной ткани. Для характеристики клеток, полученных из эндометрия методом проточной цитофлуориметрии, были отобраны 34 образца. Средний возраст пациенток составил $38,6 \pm 6,7$ лет. Все женщины были разделены на четыре группы. Первая группа — 10 пациенток с гиперпластическими процессами эндометрия, вторая группа — 6 пациенток — по данным УЗИ органов малого таза, а также при гистероскопии обнаружены признаки аденомиоза; в третью группу вошли 9 женщин с диагнозом «миома матки» (по данным УЗИ органов малого таза) и без изменений эндометрия пролиферативной или секреторной фаз по результатам гистологического исследования.

Критериями включения в исследование считали наличие у пациенток гиперпластических процессов эндометрия, миомы матки или аденомиоза, репродуктивный возраст женщин, отсутствие в анамнезе заболеваний щитовидной железы, сердечно-сосудистой системы, сахарного диабета, заболеваний почек, онкозаболеваний.

Контрольная группа включала 9 женщин, которые, по данным гистологического исследования, не имели патологических изменений эндометрия пролиферативной, либо секреторной фазы менструального цикла.

Фрагменты эндометриальной ткани, полученные при отдельном диагностическом выскабливании слизистой матки или аспирационной биопсии эндометрия, помещали в пробирки, содержащие раствор Хэнкса (HyClone) с антибиотиком.

Выделение первичной культуры стромальных клеток эндометрия. Эндометриальную ткань измельчали при помощи сосудистых ножниц до мелких кусочков. Центрифугировали при 200 об./мин. в течение 5 минут. Отмывали фрагменты эндометриальной ткани от форменных элементов крови и вновь подвергали центрифугированию при тех же условиях. После этого удаляли из пробирки надосадочную жидкость и добавляли к осадку среду для культивирования недифференцированных клеток AdvanceSTEM™, Basal Medium for Undifferentiated Mesenchymal Human Stem Cells, HyClone, содержащей 10% сыворотку для выращивания стволовых клеток (Stem Cell Growth Supplement, AdvanceSTEM, HyClone) и раствор антибиотика/антимикотика (Antibiotic/Antimycotic Solution 100x: Penicillin G, Strept-

tomycin, Amphotericin B, HyClone). Суспендировали и высевали полученную суспензию клеток на чашки Петри диаметром 35 мм. Доводили объем среды до 1, 7 мл. Клетки инкубировали в термостате при 37° и 5% CO₂. При достижении конfluenceности монослоя стромальные клетки эндометрия пересеивали в чашку большего объема. Эндометриальные стромальные клетки культивировали до 2 пассажа. Смену среды для культивирования производили на следующий день, а затем каждые 2—3 дня.

В данной работе также была получена первичная культура эпителиальных клеток эндометрия человека с использованием среды для роста эпителиальных клеток KBM, Keratinocyte Basal Medium, (LONZA). Единичные клеточные колонии переживали в условиях культивирования до 10—12-го дня культивирования, после чего колонии не визуализировались. Учитывая этот многократно повторяющийся факт, в дальнейшем работу проводили только со стромальными клетками эндометрия.

Проточная цитофлуориметрия. Фенотип стромальных клеток эндометрия анализировали при помощи лазерного проточного цитофлюориметра FACSCanto II (BD, США). Использовали моноклональные антитела, меченные FITC- (флуоресцентным красителем) или PE (фикоэритрином), к поверхностным антигенам CD34, CD45, CD73, CD105, CD90, CD146, NG2.

Статистический анализ. Для статистической обработки полученных результатов использовали пакет прикладных программ StatSoft Statistica 8. Для подсчетов применяли критерий χ^2 Пирсона, метод корреляционного анализа с вычислением коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Достоверность различий и выявленной зависимости подтверждалась при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение.

Характеристика поверхностных маркеров мезенхимальных стромальных клеток методом проточной цитофлуориметрии. Известно, что МСК могут быть выделены практически из всех тканей взрослого организма, хотя между ними отмечаются различия в степени выраженности потенций к дифференцировке и экспрессии поверхностных маркеров [7]. По-видимому, МСК локализуются в соединительной ткани, образующей строуму органов, и сопровождают кровеносные сосуды [1]. Наиболее доступными источниками мезенхимных стволовых клеток считают жировую ткань, пуповинную кровь и плаценту в силу высокого содержания стволовых клеток и клеток-предшественников, находящихся на разных стадиях дифференцировки, и фенотипической и функциональной близости этих клеток к «золотому стандарту» МСК — клеткам костного мозга [16]. Данные, полученные в мире и в нашей лаборатории, свидетельствуют о том, что эндометрий также представляет собой перспективный источник МСК как в плане биодоступности, так и для диагностики различных заболеваний в гинекологии [11, 18].

В настоящем исследовании были получены и проанализированы культуры стромальных клеток эндометрия из образцов нормальной ткани и при патологии. Выделенные клетки хорошо адгезировали к пластику и пролиферировали в условиях *in vitro*. Фенотипические особенности стромальных клеток эндометрия 2 пас-

сажа образцов нормального неизмененного эндометрия пролиферативной и секреторной фазы и эндометрия, полученного от пациенток с гиперпластическими процессами эндометрия (ГПЭ), аденомиозом (АМ) и миомой матки (ММ), были проанализированы методом проточной цитофлуориметрии. Была выявлена высокая степень совместной экспрессии таких поверхностных клеточных маркеров, как CD73 (мембраносвязанная экто-5'-нуклеотидаза, маркер созревания лимфоцитов) и CD105 (эндоглин). Количество клеток, несущих на своей поверхности данные маркеры, составило 100% в культивируемой популяции стромальных клеток эндометрия, как в контрольной группе, так и в группах сравнения (рис. 1).

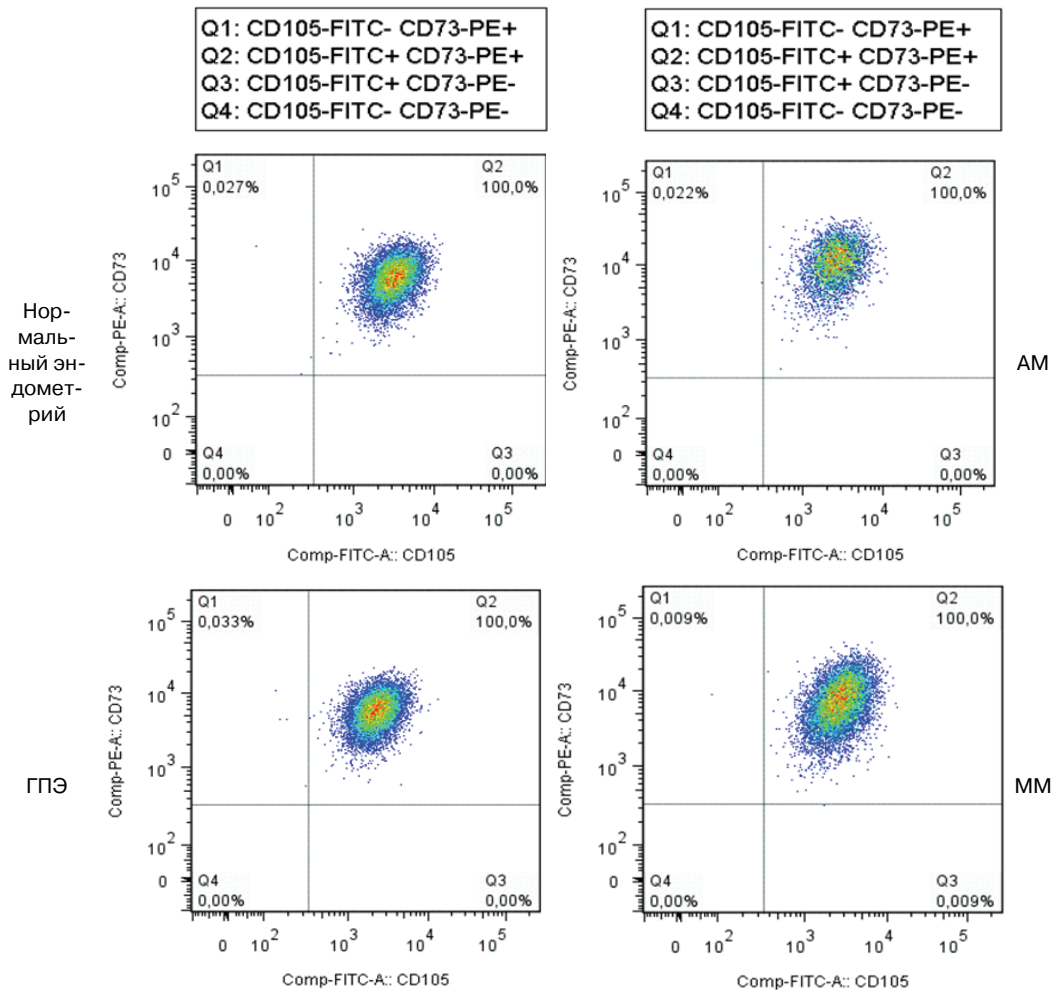


Рис. 1. Идентификация CD73⁺ CD105⁺ клеток в культуре стромальных клеток эндометрия *in vitro*. Представлены гистограммы распределения клеток в нормальном эндометрии и группах сравнения (АМ, ГПЭ, ММ). Процентное содержание таких клеток отмечено на гистограммах

Содержание CD90⁺-клеток в образцах эндометрия всех исследуемых групп не имело существенных различий и составило > 98%.

Известно, что МСК, выделяемые из других источников, содержат высокий процент перицитов — клеток, располагающихся в непосредственной близости от сосудов и вносящих важный вклад в обеспечение регенеративного потенциала эндометриальной ткани. Для их выявления и количественной оценки содержания были использованы маркеры перицитов: антитела к поверхностному протеогликану NG2 и мембранному гликопротеину CD146 [6, 8, 19]. Как оказалось, среди изучаемых популяций клеток эндометрия, культивированных до 2 пассажа, перициты встречаются как в нормальном неизменном эндометрии — до 44,9% клеток, так и при АМ, ГПЭ и ММ: до 69,5%, 38,1% и 42,1%, соответственно (рис. 2).

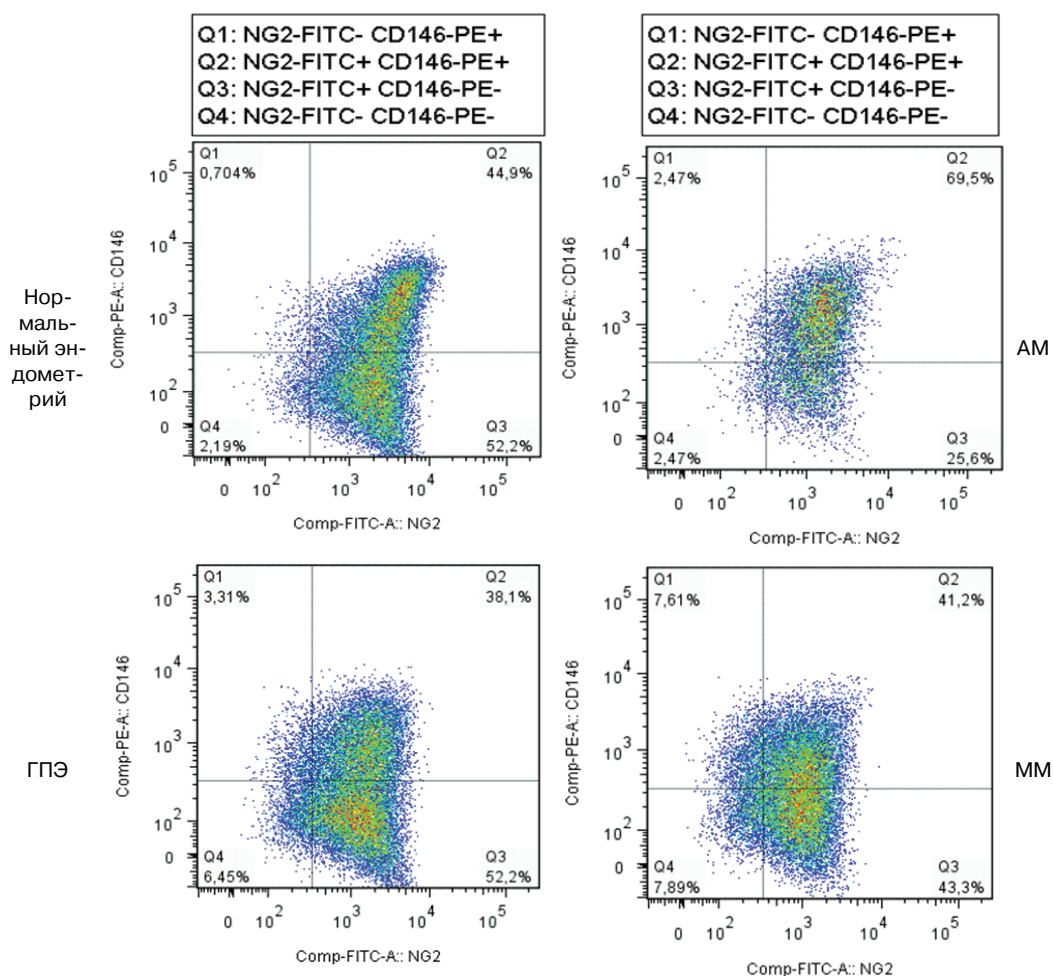


Рис. 2. Идентификация перицитов, NG2⁺ CD146⁺ клеток, среди стромальных клеток нормального эндометрия и в группах сравнения (ГПЭ, ММ, АМ).
Процентное содержание таких клеток отмечено на гистограммах.

Дальнейший анализ методом проточной цитофлуориметрии показал, что популяция NG2⁺CD146⁺ эндометриальных стромальных клеток содержит небольшой процент клеток, позитивных в отношении экспрессии маркеров клеток гематопо-

этического ряда CD34 (молекула межклеточной адгезии, маркер гематопозитических стволовых клеток) и CD45 (общий лейкоцитарный антиген). В нормальном эндометрии клеток, коэкспрессирующих CD34 и CD45, выявлено не было. Незначительная доля эндометриальных клеток, одновременно экспрессирующих оба маркера, присутствовала в популяциях стромальных клеток при ММ — 0,14%, АМ — 0,09% и ГПЭ — 0,08%.

Таким образом, в настоящем исследовании впервые был проведен сравнительный анализ фенотипических особенностей эндометриальных МСК, выделенных из образцов неизмененного эндометрия пролиферативной и секреторной фаз и эндометрия пациенток с гинекологическими заболеваниями: гиперпластическими процессами эндометрия, аденомиозом и миомой матки. Была отработана методика выделения и культивирования МСК из биоптатов нормального эндометрия и эндометрия, полученного от пациенток с ГПЭ, ММ, АМ. По результатам настоящего исследования, клетки, выделенные из биоптатов эндометрия, полученных при раздельном диагностическом выскабливании слизистой матки и культивированные до 2 пассажа, соответствуют минимальным критериям и являются МСК (согласно требованиям Международного общества клеточной терапии 2006 года) [9]. Полученные результаты согласуются с данными S. Kurchiev и соавторов, анализировавших мезенхимальные свойства стромальных клеток базального эндометрия и децидуальных клеток [13]. Клетки, получаемые нами из эндометрия, как нормального (пролиферативная или секреторная фазы менструального цикла), так и при ГПЭ, АМ, ММ имеют фибробластоподобную форму и хорошо адгезируют на пластике. Практически в 100% клетки экспрессируют на своей поверхности такие маркеры, как CD73, CD105, CD90, и не экспрессируют маркеры клеток гематопозитического ряда CD34, CD45. Гомогенность получаемой популяции МСК, выделяемой из эндометрия, оказывается даже выше в сравнении с МСК из жировой ткани [21].

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что из биоптатов нормального эндометрия и эндометрия при заболеваниях тела матки получена практически гомогенная популяция мезенхимальных стромальных клеток, имеющих характерные фенотипические черты, свойственные этим клеткам [5, 9].

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Caplan A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine // *J. Cell Physiol.* — 2007. — 213. — P. 341—347.
- [2] Cervello I., Simon C. Somatic stem cells in the endometrium // *Reprod sci.* — 2009. — 16 (2). — P. 200—205.
- [3] Cervello I., Martinez-Romero A., Martinez-Conerjero J.A. et al. Is the side — population phenotype an essential characteristic for the stem cells in human endometrium? // *Reprod. Sci.* — 2008. — 15 (suppl 2): 72A.
- [4] Cervello I., Mas A., Gil-Sanchis C., Peris L., Faus A. et al. Reconstruction of endometrium from human endometrial side population cell lines // *PLoS ONE.* — 2011. — 6(6): e21221.
- [5] Conget P.A., Minguell J.J. Phenotypical and functional properties of human bone-marrow mesenchymal progenitor cells // *J. Cell. Physiol.* — 1999. — № 181. — P. 67—73.

- [6] Covas D.T., Panepucci R.A., Fontes A.M., Silva W.A., Orellana M.D., Freitas M.C., Neder L., Santos A.R., Peres L.C., Jamur M.C., Zago M.A. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts // *Exp. Hematol.* — 2008. — 36 (5). — P. 642—54.
- [7] Crisan M., Yap S., Castellia L., Chen C.W., Corselli M., Park T.S., Andriolo G., Sun B., Zheng B., Zhang L., Norotte C., Teng P.N. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs // *Cell Stem Cell.* — 2008. — 3. — P. 301—313.
- [8] Diaz-Flores L., Gutierrez R., Madrid J.F. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche // *Histol. Histopathol.* — 2009. — 24 (7). — P. 909—69.
- [9] Dominici M., Le B.K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement // *Cytotherapy.* — 2006. — 8. — P. 315—317.
- [10] Gargett C.E., Chan R.W., Shwarb K.E. Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: role of stem/progenitor cells // *Mol. Cell Endocrinol.* — 2008. — 288(1—2). — P. 22—9.
- [11] Gargett C.E., Masuda H. Adult stem cells in the endometrium // *Mol. Hum. Reprod.* — 2010. — 16(11). — P. 818—34. doi: 10.1093/molehr/gaq061.
- [12] Gargett C.E., Shwarb K.E., Zillwood R.M., Nguyen H., Di Wo. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from the human endometrium // *Biol. Reprod.* — 2009. — 80(6). — P. 1136—45. doi: 10.1095/biolreprod.108.075226.
- [13] Kyurkchiev S., Shterev A., Dimitrov R. Assessment of presence and characteristics of multipotent stromal cells in human endometrium and decidua // *Reprod. Biolmed. Online.* — 2010. — 20(3). — P. 305—13. doi: 10.1016/j.rbmo.2009.12.011.
- [14] Maruyama T., Yoshimura Y. Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of uterine endometrium // *Endocr. J.* 2008, 55(5): 795—810.
- [15] Masuda H., Matsuzaki Y., Hiratsu E., Ono M., Nagahashi T. et al. Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration // *PLoS ONE.* — 2010. — 5(4): e10387.
- [16] Mosna F., Sensebe L., Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide // *Stem Cell Dev.* — 2010. — 19(10). — P. 1449—70. doi: 10.1089/scd.2010.0140.
- [17] Musina R.A., Belyavski A.V., Tarusova O.V., Solovyova E.V., Sukhikh G.T. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* — 2008. — 145 (4). — P. 539—543.
- [18] Patel A.N., Silva F. Menstrual blood stromal cells: the potential for regenerative medicine // *Reprod Med.* — 2008. — 3(4). — P. 443—444.
- [19] Russell K.C., Phinney D.G., Lacey M.R., Barrilleaux B.L., Meyertholen K.E., O'Connor K.C. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment // *Stem Cells.* — 2010. — 28(4). — P. 788—98. doi:10.1002/stem.312.
- [20] Schwab K.E., Hutchinson P., Gargett C.E. Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells // *Hum Reprod.* — 2008. — 23(4). — P. 934—43.
- [21] Zimmerlin L., Donnerberg V.S., Rubin J.P., Donnerberg A.D. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitors cells // *Cytometry Part A.* — 2013. — 83A(1). — P. 134—140.

THE FEATURES OF MESENCHIMAL STROMAL CELLS OF NORMAL ENDOMETRIUM AND ENDOMETRIUM FROM PATIENTS WITH DIFFERENT GYNECOLOGICAL DISEASES

T.A. Anikina, V.E. Radzinsky,
Department of obstetrics and gynecology
Peoples' Friendship University of Russia
Miklucho-Maklay str., 8, Moscow, Russia, 117198

K.A. Rubina, V.Yu. Sysoeva
Faculty of Fundamental Medicine
Lomonosov Moscow State University
Lomonosovsky Prospekt, 31-5, Moscow, Russia, 119192

This is the only experimental study that offers mechanical isolation of stromal cells from normal endometrium and endometrium from patients with adenomyosis, uterine myoma and endometrial hyperplasia. Endometrial stromal cells have been cultured and characterized. And there are comparative data on the expression of surface markers, which are phenotypic features of mesenchimal stem cells, by endometrial stromal cells.

Key words: human endometrium, mesenchimal stromal (stem) cells, cell surface markers.