БИОТЕХНОЛОГИЯ, 2024, том 40, № 4, с. 63–72

МЕДИЦИНСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 618.14-006.36;57.085.23;575.164

НОВАЯ РЕЛЕВАНТНАЯ КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ ЛЕЙОМИОМЫ МАТКИ: СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

© 2024 г. Н. Ю. Швед[1], А. А. Егорова[1], С. В. Штыкалова[1], Н. С. Осиновская[1], И. Ю. Коган[1], А. В. Киселев[1, *]

[1]ФГБНУ "НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта", Санкт-Петербург, 199034 Россия

**e-mail: kiselev-anton-otta@yandex.ru*

Поступила в редакцию 28.05.2024 г.
После доработки 09.07.2024 г.
Принята к публикации 26.07.2024 г.

Лейомиома матки (ЛМ) представляет собой доброкачественную опухоль моноклонального происхождения, развивающуюся из гладкомышечных клеток и содержащую различное количество волокнистой соединительной ткани. Лейомиомы и миометрий схожи по клеточному составу, но различаются по клеточным транскриптомным профилям. В данной работе описан быстрый и надежный метод выделения и культивирования первичных клеток ЛМ. Оптимизированы условия для выращивания и поддержания монослойной культуры клеток ЛМ *in vitro*. Оценено влияние половых стероидных гормонов, эстрадиола и прогестерона, на генетические маркеры ЛМ. Для предотвращения потери драйверных мутаций в генах *MED12* и *HMGA2* предложено использование клеточной модели ЛМ, культивируемой в специализированной питательной среде с добавлением прогестерона на первом пассаже.

Ключевые слова: лейомиома матки, клеточная модель, *MED12*, *HMGA2*

DOI: 10.56304/S0234275824040094

Лейомиома матки (ЛМ) является самой распространенной гормонально зависимой доброкачественной опухолью, состоящей преимущественно из гладкомышечных клеток, и часто приводит к многочисленным репродуктивным осложнениям. Интрамуральные (трансмуральные) лейомиомы дна и тела матки являются самыми распространенными и встречаются в 95% случаев ЛМ [1]. Зачастую имеют интрамурально-субсерозную или интрамурально-субмукозную локализацию в теле матки. Несмотря на обширные исследования, нет единого мнения относительно основных причин возникновения и развития ЛМ. Главной причиной этого является выраженная меж- и внутриопухолевая гетерогенность, обусловленная многообразием и особенностью строения клеток, различными и сложными механизмами, лежащими в основе патобиологии ЛМ [2]. Механизмы, запускающие рост опухоли, достоверно не известны, но несомненна центральная роль половых стероидных гормонов – эстрогенов, прогестерона и их рецепторов в моделировании роста, дифференцировки и функции миометрия [3]. Эстрогены и прогестерон контролируют местные ауто- и паракринные факторы (факторы роста, цитокины и др.). Результатом их избыточной продукции является ускорение клеточной пролиферации, гипертрофия клеток, увеличение объема межклеточного матрикса, и нередко отмечается сочетание этих явлении.

Другие исследования показали, что эстрогены и прогестерон активируют сигнальные пути (WNT/β-катенин, MAPK/ERK, TGF-β/SMAD), что приводит к стимуляции различных факторов транскрипции с последующей передачей сигналов, в конечном итоге приводящих к клональной пролиферации ЛМ. Прогестерон и рецепторы прогестерона влияют на пролиферацию новообразования, регулируя экспрессию факторов роста, например, эпидермальный фактор роста (EGF) [4].

Современные данные убедительно свидетельствуют о том, что соматические мутации *MED12* и хромосомные перестройки с участием гена *HMGA2* являются наиболее частыми драйверными мутациями при ЛМ [5–9]. Кроме того, в миоматозных узлах часто выявляются новые типы хромосомных делеций и транслокаций. Среди них наиболее распространенными являются транслокации занимающие хромосомный регион 12q14-15, и делеции части длинного плеча хромосомы 7 [10]. Факторы, влияющие на рост миом, представляют большой интерес и часто изучаются *in vitro* с ис-

Список сокращений: ЛМ – лейомиома; DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline)- фосфатный забуференный солевой раствор Дульбекко.

пользованием клеточных моделей, что делает этот подход широко распространенной модельной системой для изучения патогенеза и лекарственной терапии заболевания [2, 11, 12].

Одним из важнейших инструментов, используемых в клеточной и молекулярной биологии, являются культуры клеток. Они являются модельными системами для изучения не только нормальной физиологии и биохимии клеток (включая такие процессы, как старение, окислительный стресс), но и влияния на живой организм лекарственных препаратов и токсических соединений, процессов мута- и канцерогенеза. Особое место в доклинических исследованиях занимают подходы *in vitro*. Считается, что первичная культура лучше других моделирует сам организм, его ткани или новообразования, но в результате процесса культивирования может утратить свой исходный фенотип и вызвать сомнение в актуальности экспериментов. В ряде работ было показано, что мутация в гене *MED12* совпадает с резко сниженной способностью клеток ЛМ к росту *in vitro*, что приводит к их быстрому исчезновению в первичной культуре клеток и ставит под сомнение целесообразность использования существующих клеточных моделей опухоли для биомедицинских исследований [13].

ЛМ представляет собой доброкачественную опухоль, состоящую из различных клеточных популяций (фибробласты, гладкие мышцы, стволовые клетки), встроенных во внеклеточный матрикс, взаимодействующих друг с другом, обеспечивая тем самым пролиферацию. К настоящему времени описано несколько методик выделения клеточных культур ЛМ, но все они не позволяют сохранить мутации гена *MED12* в процессе субкультивирования [13–15]. Первичные культуры, полученные из узлов ЛМ с перестройкой *HMGA2*, могут сохраняться гораздо дольше [14, 15]. Ранее нами был описан протокол создания клеточной модели ЛМ, позволяющий продлить существование клеток, мутантных по *MED12* в культуре [16]. Однако не было изучено влияние половых стероидных гормонов (прогестерона и эстрадиола) на генетические маркерные системы ЛМ – драйверные мутации в гене *MED12* и гиперэкспрессию *HMGA2*.

Перспективным экспериментальным подходом для определения наиболее эффективных вариантов терапии считается проведение тестирования на различных клеточных моделях, полученных из опухолей пациентов. Остается весьма актуальным создание оптимальных условий культивирования клеток ЛМ *in vitro*, максимально приближенных к физиологическому состоянию *in vivo*. Важным условием является поддерживание основных драйверных генетических изменений – мутации в экзоне 2 гена *MED12* и сверхэкспрессии гена *HMGA2* в культуре клеток. Фактически генетический анализ следует рассматривать как основной параметр для характеристики полученных моделей.

Цель настоящей работы – разработать соответствующую этим требованиям методику выделения клеток из ткани ЛМ, полученной после миомэктомии или гистерэктомии, и культивирования в виде краткосрочной монослойной модели.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Биоматериалом для построения модели служили 8 образцов иссеченных миоматозных узлов интрамуральной (интрамурально-субсерозной/субмукозной) локализации, удаленные при операции. Исследование проводили в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации и было одобрено Комитетом по этике НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта (протокол 89 утвержден 22 декабря 2017 г.). Фрагментацию ткани проводили в стерильных условиях ламинарного бокса II класса. Все инструменты перед процедурой стерилизовали автоклавированием. Создание клеточной модели требует обработки коллагеназой IV для разрушения ткани ЛМ и обеспечения миграции клеток из ее иссеченных фрагментов. Наиболее важным компонентом является среда Gibco® AmnioMAX™ C-100 Complete Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), которая должна использоваться для обеспечения жизнеспособности гетерогенного клеточного состава ЛМ в культуре. Поскольку лейомиома матки гормональнозависимая патология, непосредственно в культуральную среду добавляли раствор эстрогена (17β-эстрадиол в конечной концентрации 10^{-8} М (Sigma Aldrich, США)) и прогестерона (в конечной концентрации 10^{-6} М (Sigma Aldrich)) для поддержания клеточной модели. Часть клеток культивировали в стандартном варианте, без добавления гормонов.

Получение первичной культуры клеток из фрагментов узлов лейомиомы, обработанных коллагеназой

Фрагменты опухоли, общим объемом не менее 3.0–3.5 $см^3$, промывали в трех сменах физраствора, затем помещали в чашку Петри с 15.0 мл физраствора и измельчали скальпелем (ножницами) на фрагменты диаметром около 1–2 мм. Затем суспензию переносили в центрифужные пробирки объемом 15.0 с 5.0 мл питательной среды Eagle's MEM (“Биолот”, Санкт-Петербург, Россия) и 2.5 мг коллагеназы IV типа (Sigma Aldrich), что соответствует активности фермента 200 Ед/мл. Пробирки с суспензией ткани опухоли инкубировали в наклонном положении в течение 90–120 мин при 37°C, периодически встряхивали или ресуспендировали. После инкубации добавляли в пробирки 5.0 мл DPBS и ресуспендировали с помо-

щью автоматической пипетки объемом 5.0 мл, чтобы получить взвесь клеток. Затем клетки центрифугировали в течение 10 мин при 200 g (центрифуга CM-6M, ELMI Ltd., Latvia), удаляли супернатант, отделяя клеточный осадок. Процедуру повторяли дважды. Затем добавляли в пробирки по 6.0 мл предварительно разбавленной AmnioMax Basal Medium с сывороткой AmnioMax Supplement (Thermo Fisher Scientific). Полученную суспензию переносили в 3 культуральных флакона T-25 (Thermo Fisher Scientific) по 2.0 мл с помощью одноразовой стерильной пипетки Пастера. Добавляли эстроген (17β-эстрадиол в конечной концентрации 10^{-8} М), прогестерон (в конечной концентрации 10^{-6} М) соответственно, оставляя третий, контрольный, без гормональной добавки. Инкубировали в течение 12–18 дней при 37°C и 5% CO_2 до достижения 80%-ной конфлюэнтности. Культуральную среду меняли каждые 3–4 дня.

Когда первичные (p0) культуры ЛМ достигали 80% конфлюэнтности (рис. 1), их использовали для экспериментов или для первого пассажа. Рекомендуется брать не менее 10–15% клеток p0, чтобы через 7–12 дней достичь 80% конфлюэнтности культуры p1. Жизнеспособность клеток после пассажа контролировали с помощью теста исключения трипанового синего [17].

При помощи предлагаемой методики выход клеток из фрагментов миомы после обработки коллагеназой IV составляет от 900 до 1300 клеток в мкл (согласно данным подсчета в камере Горяева). Клеточная суспензия, переносимая в культуральные флаконы (4–6 шт.), содержит микрофрагменты ткани миомы, из которых также может происходить миграция клеток, что дополнительно увеличивает их выход в культуру. При культивировании в течение 12–18 дней и получения 80% конфлюентности количество клеток составляет 350000–400000 в одном флаконе площадью 25 $см^2$.

Замораживание культур клеток лейомиомы и выделение нуклеиновых кислот

Клетки во флаконе дважды промывали раствором Версена 0.3% (“BioloT”, Россия). Затем добавляли по 700 мкл свежеприготовленной смеси раствора Трипсин 0.25% (“BioloT”) – Версена в соотношении 1 : 3, инкубировали в течение 4–5 мин при +37°C. Затем добавляли 5.0 мл 0.9%-ного NaCl и, аккуратно пипетируя раствором, снимали клетки со дна флакона. Переносили клеточную суспензию в центрифужные пробирки объемом 15.0 мл и центрифугировали в течение 10 мин при 200 × g (центрифуга CM-6M, ELMI Ltd.), удаляли супернатант и отделяли клеточный осадок. Затем добавляли в пробирки 5.0 мл DPBS, хорошо ресуспендировали осадок и центрифугировали его в

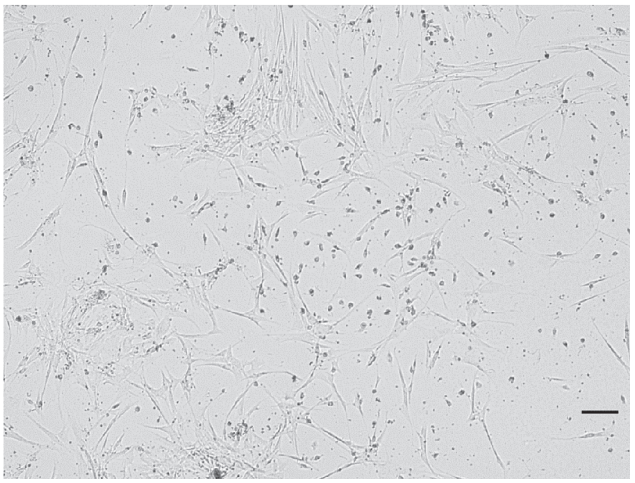

Рис. 1. Репрезентативная микрофотография клеточной модели ЛМ: первичные клетки ЛМ при p0. Инвертированный микроскоп. Фазовый контраст. Увеличение ×40; масштаб 200 мкм. На фотографии хорошо видно наличие морфологически различных клеток, единично располагающихся на подложке или организованных в колонии разной плотности.
Fig. 1. Representative micrography of the LM cell model: primary LM cells at p0. An inverted microscope. Phase contrast. Magnification ×40; scale 200 μm. The photos highlight the presence of morphologically distinct cells, which are either individually located on a surface or organized into colonies with varying densities.

течение 10 мин при 200 × g, после чего удаляли супернатант. Добавляли 300 мкл раствора DPBS, аккуратно перемешивали и аликвоты 100 мкл клеточной суспензии переносили в пробирки объемом 2.0 мл, содержащие 1.0 мл стабилизатора РНК, оставляли при комнатной температуре на 1 ч и использовали для выделения РНК или переносили в сухую пробирку объемом 2.0 мл и использовали для выделения ДНК. При необходимости, хранили в морозильной камере при температуре –80°C до 1 года.

Для изучения стабильности мутаций при хранении переносили 100 мкл клеточной суспензии в криопробирку объемом 2.0 мл, содержащую смесь из 100 мкл диметилсульфоксида и 900 мкл бычьей сыворотки, осторожно перемешивали пипетированием и выдерживали в морозильной камере при температуре –80°C не более 1 года. По нашим наблюдениям, при размораживании клеточных линий лейомиомы p0 в культуре p1 сохраняются клетки, несущие мутацию *MED12* и/или повышенную экспрессию гена *HMGA2*.

Анализ мутаций MED12

Анализ мутаций экзона 2 гена *MED12* проводили, как описано ранее, путем прямого ПЦР-секвенирования геномной ДНК в соответствии с

протоколом, неоднократно использовавшимся в нашей лаборатории [11, 12].

Выделение ДНК проводили в соответствии с инструкцией ExtractDNA Blood & Cells kit (“Евроген” Россия). Был разработан набор специфических праймеров (F: 5'-GCCCAGCTTTAAGTA-ACGATCT-3'; R: 5'-AGAAAAGTGTACCTCAGG-GTGG-3') для амплификации экзона 2 *MED12* и фланкирующих интронных последовательностей (GeneID: 9968 (MED12)).

Фрагмент гена *MED12* амплифицировали при следующих условиях термоциклирования: денатурация при 94°C в течение 7 мин, затем 32 цикла 94°C в течение 40 с, 58°C в течение 50 с и 72°C в течение 1 мин. После очистки ПЦР-продукты секвенировали с помощью набора BigDye Terminator v.3.1. (Applied Biosystems, Troy, NY, USA) с последующим капиллярным электрофорезом на генетическом анализаторе AB3130XL (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Анализ последовательностей проводился с использованием программ Sequencing Analysis 5.2, BioEdit, баз данных NCBI и Ensembl.

Обратная транскрипция РНК и анализ экспрессии гена HMGA2

1. Обратная транскрипция РНК

Обратную транскрипцию РНК проводили с использованием набора для обратной транскрипции в соответствии с инструкцией производителя. Набор (“Диаэм”, Москва, Россия) для обратной транскрипции основан на рекомбинантной обратной транскриптазе, являющейся продуктом гена pol из Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV). Проводили каждую реакцию в общем объеме 20 мкл, содержащем 10 ммоль d-NTP (“Syntol”, Россия) и 200 U/mL MMLUV в присутствии олиго-DT16 (2.5 мМ) и случайных гексамеров (3 мг/мл) с добавлением от 100 до 500 нг общей РНК. Помещали стрипы случайных олигонуклеотидных гексамеров с реакционной смесью в термоциклер T100 (Bio-Rad, США). Реакцию обратной транскрипции проводили при: +25°C – 10 мин; +37°C – 120 мин; +85°C – 5 мин; +4°C – 5 мин. Полученную кДНК использовали для проведения ПЦР в реальном времени.

2. ПЦР в реальном времени

В пробирках объемом 1.5 мл (или 2.0 мл – в зависимости от количества образцов) делали отдельные смеси для каждого набора праймеров в концентрации 5 пмоль (ген *HMGA2*: прямой 5'-AGA GTC CCT CTA AAG CAG CTC A-3'; обратный 5'-CAA CTG CTG CTG AGG TAG AAA TCG-3'), включая праймеры к гену домашнего хозяйства (ген β-*актина*: 5'-TGC CGA CAG GAT GCA GAA G-3'; обратный 5'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT-3').

Схема приготовления смеси в порядке добавления реагентов: 11.2 мкл H_2O; 4 мкл $MgCl_2$ (25 mM); 2.5 мкл dNTP's (2.5 mM); 2.5 мкл EvaGreen (10×) (“Syntol”); 1 мкл F-праймер; 1 мкл R-праймер; 0.3 мкл Taq-полимераза (“Syntol”).

Смесь перемешивали пипеткой и переносили в стрипы объемом 22.5 мкл, стараясь раскапывать близко к дну микропробирок, не оставляя капель на стенках в верхней части. Используя отдельные носики, каждый образец вносили по 2.5 мкл кДНК в двух репликах.

Пробирки помещали в амплификатор Rotor-Gene 3000 (Corbett, Австралия). Использовали соответствующую программу (одиночный цикл 95° – 5 мин; затем 38 циклов: 94 – 15 с; 60° – 60 с. Затем нагрев от 60° до 95° с шагом 0.5 градуса, по 10 с на каждый шаг).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета GraphPad Prizm 8.0 (La Jolla, CA). Значимость различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента с поправкой Уэлча. Различия между показателями считали достоверными при $p \le 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения воздействия гормонов эстрадиола и прогестерона использовали суспензии клеток, полученных из фрагментов интрамуральных (интрамурально-субсерозных, интрамурально-субмукозных) лейомиом. В большинстве исследований на клетках миомы применяются разнообразные среды, предназначенные для культивирования широкого спектра клеток животных и человека. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в условиях культуры *in vitro* клетки доброкачественной гладкомышечной опухоли имеют конечную продолжительность репликативной жизни [13–15, 18]. Для обеспечения выживаемости гладкомышечных клеток, несущих соматические мутации в генах-драйверах развития опухоли и релевантности монослойной первичной клеточной культуры мы использовали полную среду Gibco® AmnioMAX™ C-100, специально разработанную для поддержки роста различных типов клеток амниотической жидкости человека, с непосредственным добавлением эстрогенов (эстрадиол) и прогестерона. Следует отметить, что из-за межопухолевой гетерогенности ЛМ могут наблюдаться различия в скорости пролиферации и старения между клеточными линиями. По нашим наблюдениям, большинство этих линий удваивались каждые 24 ч. Первичная культура клеток (p0) может быть заморожена или непосредственно использована для экспериментальных работ, так как при соблюдении ранее разработанного про-

токола на первом пассаже она сохраняет драйверные мутации в гене *MED12* и повышенную экспрессию *HMGA2* [16]

В данной работе клетки, полученные после обработки коллагеназой IV фрагментов восьми образцов ЛМ, культивировали при разных условиях: 1) без добавления в среду гормонов (стандартные условия культивирования клеток ЛМ; 2) с добавлением в среду 10^{-8} М эстрадиола; 3) с добавлением в среду 10^{-6} М прогестерона. Концентрации добавляемых гормонов соответствовали их максимальному содержанию в сыворотке крови женщины в соответствии с менструальным циклом. Клеточные линии были успешно субкультивированы на протяжении двух–трех пассажей.

Влияние эстрадиола и прогестерона на поддержание соматических мутаций в экзоне 2 гена MED12

Был опубликован ряд работ, в которых показано, что соматические мутации в экзоне 2 гена *MED12* встречаются в миомах с частотой 50–70% [15, 16, 18]. Как правило, речь идет о делециях или однонуклеотидных заменах в кодонах 43 и 44. В исследовании Mittal P. и др. было показано, что встраивание в геном мышей мутантного аллеля гена *MED12* (самой распространенной мутации, 131G>A) ведет к развитию миом из тех клеток, где работает только мутантный аллель [19]. При этом в случае полной инактивации гена его экспрессии не наблюдалось. Нами проведено исследование клеточных линий с наиболее часто встречающимися типами однонуклеотидных замен в гене *MED12* (c.131G>A, c.130G>C) и делецией c.133_147del15. Анализ мутаций экзона 2 гена *MED12* проводили, как описано ранее, путем секвенирования геномной ДНК по Сэнгеру (рис. 2).

Мы обнаружили, что мутации гена *MED12* при стандартном культивировании (без добавления гормонов) сохраняются в первичной культуре клеток (p0) и при первом (p1) пассаже, однако, при следующих пассажах популяция мутантных клеток постепенно утрачивается. Пролиферативный потенциал клеток мутантного типа может быть ограничен как нарушением их внутриклеточной метаболической активности, так и изменением структуры меж- и внеклеточных взаимодействий в монослойной модели. Например, ранее нами было отмечено, что культивируемые фрагменты опухоли (органотипическая модель ЛМ) сохраняли мутантный генотип на протяжении 28 дней при стандартном культивировании [16]. Ассоциации между различными мутантными генотипами культивируемых клеток и их выживаемостью при пассировании обнаружено не было. На третьем пассаже в культуре клеток присутствовал только генотип дикого типа.

Добавление в культуральную среду стероидных гормонов не оказало существенного влияния на преимущественный рост клеток, имеющих мутации в гене *MED12.* При анализе ДНК клеточных клонов третьего пассажа культивирования обнаружены только клетки дикого типа.

Влияние эстрадиола и прогестерона на поддержание повышенной экспрессии гена HMGA2

Ранее было показано, что в клеточных линиях, полученных от миом с гиперэкспрессией гена *HMGA2,* наблюдается ее снижение в процессе культивирования [20]. Нами было подтверждено, что при культивировании клеток ЛМ с повышенной экспрессией гена *HMGA2* без добавления стероидных гормонов прослеживается снижение уровня экспрессии ($p < 0.05$) при каждом следующем пассаже относительно первичных клеток (p0) (рис. 3).

Возможно, снижение экспрессии гена *HMGA2* в первичных клеточных линиях ЛМ при пассировании в стандартной культуральной среде коррелирует с ограниченным потенциалом роста мутантных клеток *in vitro* из-за нарушений хрупкого баланса внутри- и межклеточного гомеостаза, вызванного изменением физиологического состояния окружающей среды.

Согласно нашим наблюдениям, непосредственное добавление в культуральную среду эстрадиола или прогестерона по-разному влияет на экспрессию гена *HMGA2* в первичных клеточных линиях ЛМ и миометрия (рис. 4). При культивировании клеток ЛМ (p1) в присутствии прогестерона увеличивается экспрессия гена *HMGA2* в клеточной линии миомы ($p < 0.05$) и не изменяется в миометрии. В то время как добавление эстрадиола не оказывает заметного влияния на уровень экспрессии гена *HMGA2* по сравнению с контролем.

Первичные клеточные линии ЛМ имеют ряд ограничений при использовании в качестве клеточной модели миомы матки. Эти культуры недостаточно хорошо охарактеризованы, имеют ограниченный срок жизни, медленно пролиферируют и, таким образом, уступают вторичным клеточным линиям. К настоящему времени описано несколько методик выделения клеточных культур ЛМ, но все они не позволяют сохранить мутации в гене *MED12* в процессе субкультивирования [13–15, 18]. Характеристики линий меняются с течением времени и от пассажа к пассажу за счет преимущественной пролиферации субклонов клеток без мутаций, что может исказить результаты экспериментов. В данной работе описан быстрый и надежный метод выделения и культивирования первичных клеток ЛМ (см. Условия эксперимента). Полученные таким образом культуры клеток ЛМ тестировали на наличие основных драйверных генетических изменений – мутации в экзоне

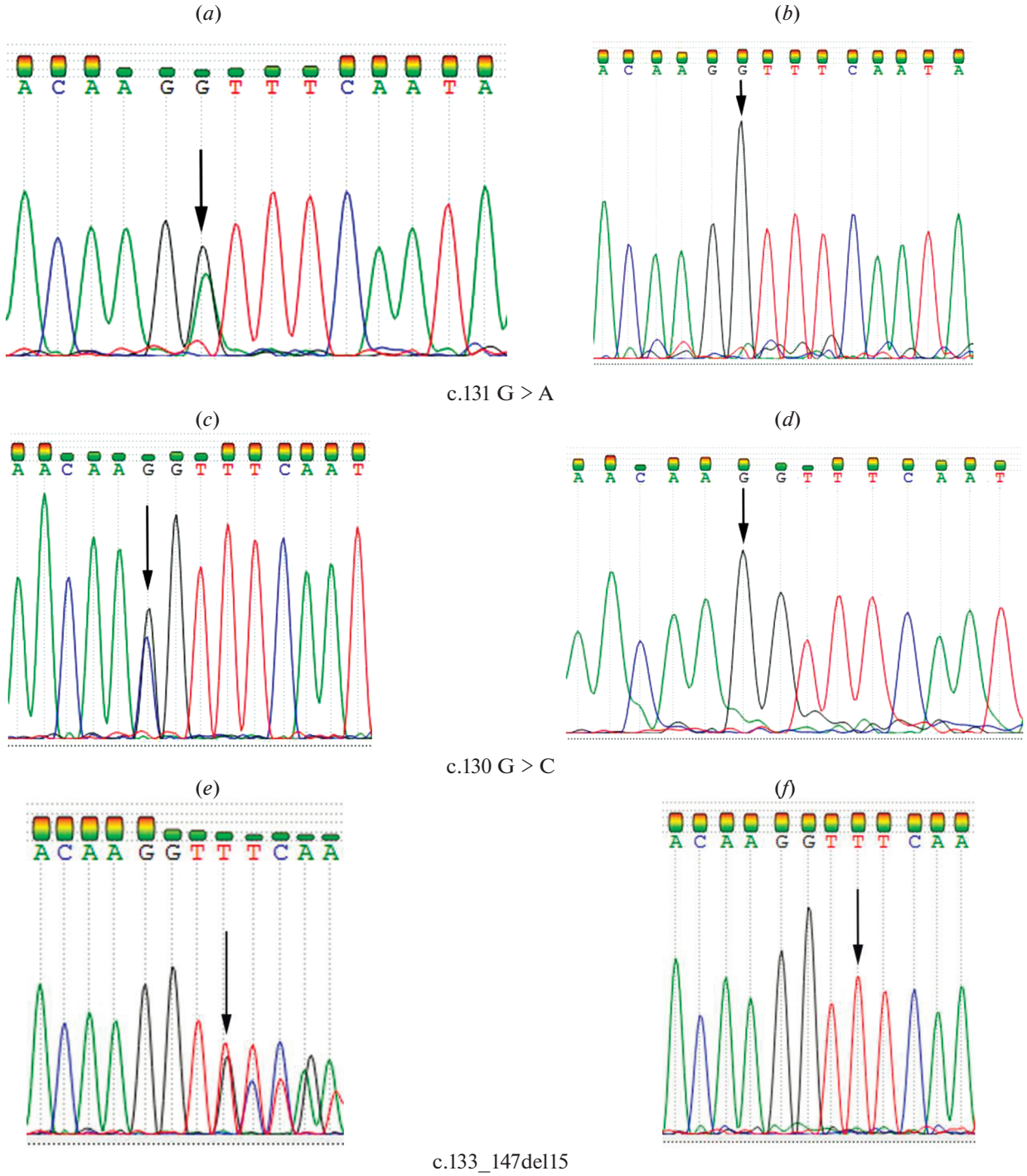

Рис. 2. Три различные гетерозиготные мутации в гене *MED12* (*a*, *b*) – миссенс-мутации c.131G>A; (*c*, *d*) – миссенс-мутации c.130 G>C; (*e*,*f*) – делеции c.133_147del15 на разных пассажах: (*a*, *c*, *e*) первичная культура p0; (*b*, *d*,*f*) p3. Мутации выявлены прямым ПЦР-секвенированием геномной ДНК, выделенной из первичной культуры на нулевом и на третьем пассаже. Пик, соответствующий мутации на позднем пассаже, исчезает.

Fig. 2. Identification of 3 different heterozygous mutations in the MED12 gene: (*a, b*) missense mutation c.131G>A; (*c*, *d*) missense mutation c.130 G>C; (*e*,*f*) deletion c.133_147del15 at different passages: (*a*, *c*, *e*) primary culture p0; (*b*, *d*,*f*) p3. Mutations were detected by direct PCR sequencing of genomic DNA isolated from the primary culture at the zero and third passage. The peak corresponding to the mutation in the late passage disappears.

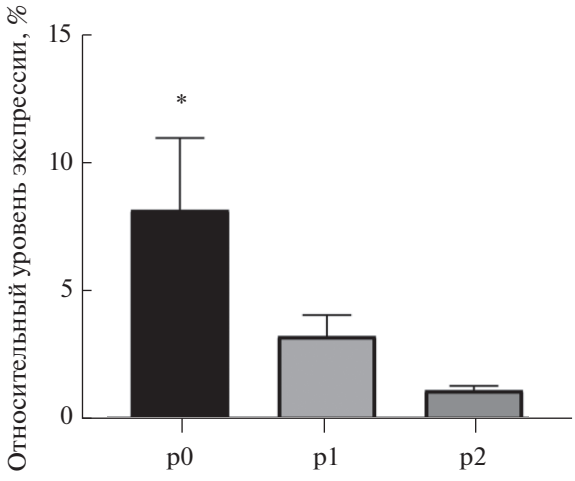

Рис. 3. Изменение экспрессии гена *HMGA2* относительно референсного гена β-*актина* в клеточных линиях ЛМ на пассажах p0; p1; p2 при культивировании в стандартных условиях. Значения приведены с указанием стандартного отклонения (±S.D.). *Примечание*. *– $p < 0.05$ при сравнении с p2.
Fig. 3. Changes in HMGA2 gene expression relative to the β-actin reference gene in LM cell lines at passages p0, p1, p2 when cultured under standard conditions.The values are given with an indication of the standard deviation (±S.D.). * – $p < 0.05$ when compared with p2. *Note*. * – $p < 0.05$ when compared with p2.

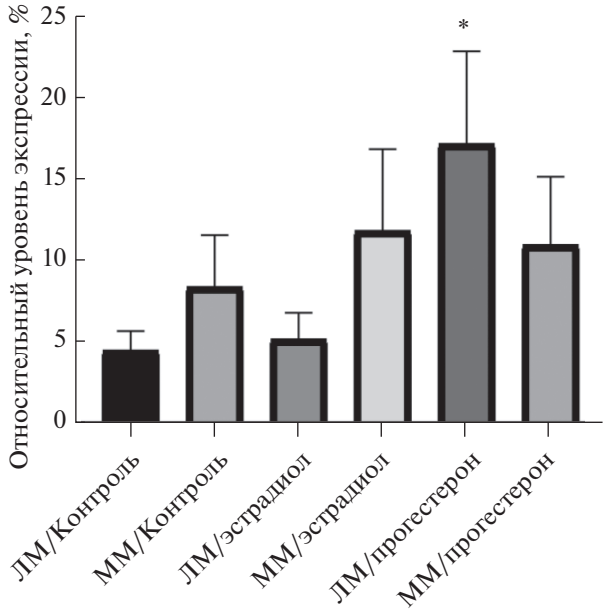

Рис. 4. Уровень экспрессии гена *HMGA2* в первичных (p1) клеточных линиях лейомиом (ЛМ) и миометрия (ММ) при культивировании в присутствии эстрадиола и прогестерона. Значения приведены с указанием стандартного отклонения (±S.D.). *Примечание*. * – $p < 0.05$ при сравнении с контролем.
Fig. 4. The expression level of the HMGA2 gene in primary (p1) cell lines of leiomyoma (LM) and myometrium (M) when cultured in the presence of estradiol and progesterone. The values are given with an indication of the standard deviation (±S.D.). *Note*. * – $p < 0.05$ when compared with the control.

2 гена *MED12* и сверхэкспрессии гена *HMGA2*. Фактически генетический анализ следует рассматривать как основной параметр для характеристики полученной модели.

Goad J. и др., в своей работе обращают внимание на схожесть типов клеточных популяций в тканях миометрия и *MED12*-позитивных ЛМ [21]. Также отмечено наличие клеточной гетерогенности внутри популяций гладкомышечных, иммунных, эндотелиальных сосудистых, лимфатических клеток и фибробластов, как в ткани миометрия так и в ЛМ, что позволило авторам усомниться в теории моноклонального происхождения опухоли. Обнаружены трансляционные и метаболические различия между идентичными популяциями клеток *MED12*-позитивных ЛМ и миометрия в результате внутриклеточного ремоделирования. Стероидные гормоны через паракринные механизмы могут вносить свой вклад и оказывать опосредованное влияние на эти типы клеток, входящие в состав ЛМ, провоцируя воспаление, иммунный ответ, неоангиогенез и, как следствие, рост опухоли. Внутри популяций гладкомышечных и эндотелиальных клеток доброкачественных опухолей также отмечается гетерогенность в пропорциональном соотношении *MED12*-позитивных/негативных субклонов. Особый интерес представляет отсутствие в популяциях фибробластов клеток, несущих мутации в гене *MED12*. Клеточный состав *MED12*-позитивных и *HMGA2*-позитивных ЛМ значительно отличается, так как последние состоят в основном из гладкомышечных клеток (до 90%), а *MED12*-позитивные ЛМ содержат равное количество гладкомышечных клеток и фибробластов [22]. Вместе с тем, секрецию внеклеточного матрикса осуществляют как гладкомышечные клетки, так и фибробласты. Вероятно, последние так же определяют межклеточную коммуникацию в ЛМ, благоприятствующую ее развитию и росту. Предыдущие исследования показали, что в первичной культуре клеток ЛМ популяция фибробластов обгоняет *MED12*-мутантные клетки [23]. Зачастую исследователи используют среды, разработанные для культивирования фибробластов и именно они получают преимущество в росте при многократном пассировании клеточных линий ЛМ. В связи с этим, считаем актуальным применение специализированной питательной среды для поддержания в культуре максимального разнообразия клеточных субпопуляций, их конкурентного роста.

В течение многих лет основной причиной возникновения доброкачественной опухоли из генетически трансформированных гладкомышечных клеток миометрия считалась гиперэстрогения, в том числе локальная, а также недостаточность лютеи-

новой фазы, хроническая ановуляция и повышенная продукция гонадотропных гормонов [3, 24]. Зависимость роста ЛМ от гормонов яичников была признана давно, и 17β-эстрадиол (Е2) считался митогеном ЛМ в течение десятилетий. Лейомиомы с перестройками *HMGA2* и мутациями *MED12* демонстрируют повышенную пролиферацию гладкомышечных клеток в присутствии эстрогенов и прогестерона, тогда как популяции фибробластов пролиферируют исключительно в ответ на эстрогены [22]. Исследование с использованием ксенотрансплантата опухоли, полученного от пациента, показало, что популяция фибробластов в *MED12*-положительных миомах чувствительна к эстрогенам, в то время как прогестерон не влияет на фибробласты [25]. Также было показано общее снижение экспрессии гормональных рецепторов в четырех *MED12*-положительных лейомиомах из пяти по сравнению с миометрием, что подчеркивает наличие индивидуальных различий среди генетически идентичных опухолей [21]. Вместе с тем, увеличение экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона кластером гладкомышечных клеток в единичном случае может быть обусловлено усиленным ростом опухоли, ее относительной "молодостью".

Генетические изменения затрагивают и хромосомный набор клеток ЛМ. Примерно в 40% случаев выявляются клональные аномалии кариотипа. Частыми среди них являются интерстициальные делеции в длинном плече хромосомы 7 (7q). Изолированое воздействие эстрадиолом и прогестероном на культивируемые клетки ЛМ с хромосомными аберрациями показало более выраженный эффект на представленность клеток с делециями в 7q по сравнению со стандартным культивированием [10]. Вариабельность полученных данных о содержании гормональных рецепторов в тканях миомы и реакции клеток *in vitro* на добавление эстрадиола и прогестерона в культуральную среду подтверждает гетерогенную природу этой распространенной опухоли.

Таким образом, с использованием разработанного нами ранее протокола создания модели ЛМ, позволяющего продлить существование клеток, мутантных по *MED12* в культуре, исследовано влияние половых стероидных гормонов на генетические маркерные системы ЛМ, драйверные мутации в гене *MED12* и гиперэкспрессии *HMGA2*. Обнаружено, что добавление в культуральную среду прогестерона увеличивает экспрессию гена *HMGA2* в клеточных линиях ЛМ по сравнению со стандартным культивированием, в то время как эстрадиол не оказывает влияния на профиль экспрессии. Необходимы дальнейшие исследования для понимания клеточных взаимодействий в ответ на гормоны яичников, их возможный вклад в дисрегуляцию сигнальных путей биологического развития опухоли. Специфичный ответ опухолевых клеток на действие половых гормонов позволяет предположить сложный паракринный процесс взаимодействия между гладкомышечными клетками, фибробластами и популяциями других типов клеток для координации роста и развития опухоли, и быть причиной отсутствия положительного эффекта таргетной терапии у многих пациенток с ЛМ. Дифференцированное воздействие эстрадиола и прогестерона на *MED12* и *HMGA2*-позитивные ЛМ подчеркивает важность подтипов и генотипов при разработке нехирургических терапевтических стратегий для ЛМ. Развитие органосохраняющих неоперативных (медикаментозных) технологий в последние годы является приоритетным направлением в мировой гинекологической практике, а создание релевантных клеточных моделей на сегодняшний день не утратило актуальность. Моделирование оптимальных условий пролиферации различных субклонов клеток ЛМ *in vitro*, максимально приближенных к физиологическому состоянию *in vivo*, за счет присутствующих в культуральной среде специфических ростовых факторов, добавления прогестерона и использование субкультуры не далее второго пассажа является необходимым условием для получения корректных результатов при проведении научных экспериментов. Проведение тестирования на различных клеточных моделях, полученных из опухолей пациентов, представляет собой перспективный экспериментальный подход для определения наиболее эффективных вариантов терапии. Предложенное нами культивирование клеточной модели ЛМ в специализированной питательной среде с добавлением прогестерона на первом пассаже, предотвращает потери драйверных мутаций в гене *MED12* и поддерживает экспрессию *HMGA2*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Статья подготовлена к публикации в рамках выполнения государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 1021062812133-0-3.2.2 "Оптимизация методов предикции, профилактики и лечения "больших акушерских синдромов", а также стратегии родоразрешения у беременных из групп высокого риска, с целью улучшения акушерских и перинатальных исходов".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Аверкин Н.С., Федорова М.Г., Вишнякова Ж.С., Евсеева О.П., Пряженцева Т.В.* Этиология, патогенез и морфологические варианты миомы матки (обзор литературы). *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки,* 2023, 3, 172–187. https://doi.org/10.21685/2072-3032-22
2. *Bonazza C., Andrade S.S., Sumikawa J.T., Batista F.P., Paredes-Gamero E.J., Girão1 M.J.B.C., Oliva M.L.V., Castro R.A.* Primary Human Uterine Leiomyoma Cell

Culture Quality Control: Some Properties of Myometrial Cells Cultured under Serum Deprivation Conditions in the Presence of Ovarian Steroids. *PLoS One,* 2016, 11(7), e0158578.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158578

3. *Ярмолинская М.И., Поленов Н.И., Куница В.В.* Миома матки-роль сигнальных путей в патогенезе заболевания (обзор литературы). *Журн. акушерства и женских болезней*, 2020, 69(5), 113–124.
https://doi.org/10.17816/JOWD695
4. *Koltsova A.S., Efimova O.A., Pendina A.A.* A View on Uterine Leiomyoma Genesis through the Prism of Genetic, Epigenetic and Cellular Heterogeneity *Int. J. Mol. Sci.,* 2023, 24(6), 5752.
https://doi.org/10.3390/ijms24065752
5. *Klemke M., Meyer A., Nezhad M.H., Bartnitzke S., Drieschner N., Frantzen C., Schmidt E.H., Belge G., Bullerdiek J.* Overexpression of HMGA2 in uterine leiomyomas points to its general role for the pathogenesis of the disease. *Genes Chromosome Canc.,* 2009, 48, 171–178.
https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2017.05.3465
6. *Mäkinen N., Mehine M., Tolvanen J., Kaasinen E., Li Y., Lehtonen H.J., Gentile M., Yan J., Enge M., Taipale M., Aavikko M., Katainen R., Virolainen E., Böhling T., Koski T.A., Launonen V., Sjöberg J., Taipale J., Vahteristo P., Aaltonen L.A.* MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. Science, 2011; 334(6053), 252–255.
https://doi.org/10.1126/science.1208930
7. *Markowski D.N., Bartnitzke S., Löning T., Drieschner H., Helmke B., Bulle J.* MED12 mutations in uterine fibroids – their relationship to cytogenetic subgroups. *Int. J. Cancer.*, 2012, 131(7), 1528–1536.
https://doi.org/10.1002/ijc.27424
8. *McGuire M.M., Yatsenko A., Hoffner L., Jones M., Surti U., Rajkovic A.* Whole exome sequencing in a random sample of North American women with leiomyomas identifies MED12 mutations in majority of uterine leiomyomas. *PLoS One*, 2012, 7(3), e33251.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033251
9. *Heinonen H.-R., Sarvilinna N.S., Sjöberg J., Kämpjärvi K., Pitkänen E., Vahteristo P., Mäkinen N., Aaltonen L.A.* MED12 mutation frequency in unselected sporadic uterine leiomyomas. *Fertil. Steril.*, 2014, 102(4), 1137–1342.
https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.040
10. *Кольцова А.С., Ефимова О.А., Баранов В.С., Ярмолинская М.И., Поленов Н.И., Пендина А.А.* Дифференциальный эффект воздействия эстрогеном и прогестероном на клетки лейомиомы матки с делециями хромосомы 7 в системе *in vitro. Экологическая генетика человека* 2023, 21(4), 317–327.
https://doi.org/10.17816/ecogen606642
11. *Moss N.S., Benditt E.P.,* Human Atherosclerotic Plaque Cells and Leiomyoma *Am. J. Pathol.,* 1975, 78(2), 175–190.
12. *Штыкалова С.В., Егорова А.А., Маретина М.А., Фрейнд, С.А., Баранов В.С., Киселев А.В.* Молекулярно-генетические основы и перспективы генной терапии миомы матки. *Генетика*, 2021, 57, 995–1010.
https://doi.org/10.1134/S1022795421090118
13. *Bloch J., Holzmann C., Koczan D., Helmke B.M., Bullerdiek J.* Factors affecting the loss of MED12-mutated leiomyoma cells during in vitro growth. *Oncotarget,* 2017, 8, 34762–34772.
https://doi.org/10.18632/oncotarget.16711
14. *Markowski D.N., Tadayyon M., Bartnitzke S., Belge G., Helmke M.B., Bullerdiek J.* Cell cultures in uterine leiomyomas: Rapid disappearance of cells carrying MED12 mutations. *Genes Chromosome Canc.,* 2014, 53, 317–323.
https://doi.org/10.1002/gcc.22142
15. *Holzmann C., Markowski D.N., Bartnitzke S., Koczan D., Helmke B.M., Bullerdiek J.* A rare coincidence of different types of driver mutations among uterine leiomyomas (UL). *Mol. Cytogenet.*, 2015, 8, 76–82.
https://doi.org/10.1186/s13039-015- 0177-9
16. *Shved N., Egorova A., Osinovskaya N., Kiselev A.* Development of primary monolayer cell model and organotypic model of uterine leiomyoma. *Methods Protoc.,* 2022, 5(1), 16.
https://doi.org/10.3390/mps5010016
17. *Egorova A., Kiselev A., Hakli M., Ruponen M., Baranov V., Urtti A.* Chemokine-derived peptides as carriers for gene delivery to CXCR4 expressing cells. *J Gene Med.*, 2009, 11, 772–781.
https://doi.org/10.1002/jgm.1366
18. *Osinovskaya N.S., Malysheva O.V., Shved N.Yu., Ivashchenko T.E., Sultanov I.Yu., Efimova O.A., Yarmolinskaya M.I., Bezhenar V.F., Baranov V.S.* Frequency and Spectrum of MED12 Exon 2 Mutations in Multiple Versus Solitary Uterine Leiomyomas From Russian Patients. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 2016, 35(6), 509–515.
https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000255
19. *Mittal P., Shin Y.H., Yatsenko S.A., Castro C.A., Surti U., Rajkovic A.* Med12 gain-of-function mutation causes leiomyomas and genomic instability. *J. Clin. Invest.,* 2015, 125(8), 3280–3284.
https://doi.org/10.1172/JCI81534
20. *Markowski D.N., Bartnitzke S., Belge G., Drieschner N., Helmke B.M., Bullerdiek J.* Cell culture and senescence in uterine fibroids. *Cancer Genet. Cytog.,* 2010, 202(1), 53–57.
https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2010.06.010
21. *Goad J., Rudolph J., Zandigohar M., Tae M., Dai Y., Wei J.-J., Bulun S.E., Chakravarti D., Rajkovic A.* Single-cell sequencing reveals novel cellular heterogeneity in uterine leiomyomas. *Hum. Reprod.,* 2022;37(10), 2334–2349.
https://doi.org/10.1093/humrep/deac183
22. *Wu X., Serna V.A., Thomas J., Qiang W., Blumenfeld M.L., Kurita T.* Subtype-specific cancer-associated fibroblasts contribute to the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Cancer Res.,* 2017, 77(24), 6891–6901.
https://doi.org/10.1158/0008-5472
23. *Bloch J., Holzmann C., Koczan D., Helmke B.M., Bullerdiek J.* Factors affecting the loss of MED12-mutated leiomyoma cells during in vitro growth. *Oncotarget*, 2017, 8(21), 34762–34772.
https://doi.org/10.18632/oncotarget.16711
24. *Bulun S.E.,* Uterine fibroids. *N. Engl. J. Med.*, 2013, 369(14), 1344–1355.
https://doi.org/10.1056/NEJMra1209993
25. *Wu S.P., DeMayo F.J.* Progesterone receptor signaling in uterine myometrial physiology and preterm birth. *Curr. Top. Dev. Biol.,* 2017, 125, 171–190.
https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.03.001

New Relevant Cellular Model of Uterine Leiomyoma: The Method of Isolation and Prospects of Use

N. Yu. Shved[a], A. A. Egorova[a], S. V. Shtykalova[a], N. S. Osinovskaya[a], I. Yu. Kogan[a], and A. V. Kiselev[a, #]

[a] *"Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott", St. Petersburg, 199034 Russia*

[#] *e-mail: kiselev-anton-otta@yandex.ru*

Abstract—Uterine leiomyoma (UL) is a benign tumour of monoclonal origin developing from smooth muscle cells and containing varying amounts of fibrous connective tissue. Leiomyomas and myometrium are similar in cellular composition but differ in cellular transcriptome profiles. This paper describes a rapid and reliable method for isolating and culturing primary UL cells. Conditions for growing and maintaining a monolayer culture of UL cells in vitro were optimised. The effect of sex steroid hormones, estradiol and progesterone, on UL genetic markers was evaluated. To prevent the loss of driver mutations in *MED12* and *HMGA2* genes, the use of UL cell model cultured in specialised nutrient medium with the addition of progesterone at the first passage was proposed.

Keywords: uterine leiomyoma, cell model, *MED12*, *HMGA2*