

УДК 57.085.23:618.1

## ДЕЦИДУАЛЬНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

© 2019 г. М. А. Петросян<sup>1</sup>\*, Н. О. Мележникова<sup>1</sup>, А. П. Домнина<sup>2</sup>, О. В. Малышева<sup>1</sup>, Н. Ю. Швед<sup>1</sup>, Л. И. Петрова<sup>1</sup>, Л. С. Полянских<sup>1</sup>, Е. В. Базиян<sup>1</sup>, А. С. Молотков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, 199034 Россия

<sup>2</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

\*E-mail: mariya@labpharm.spb.ru

Поступила в редакцию 19.07.2019 г.

После доработки 12.08.2019 г.

Принята к публикации 12.08.2019 г.

Работа посвящена изучению способности клеточных линий, полученных из эндометрия гинекологически здоровых пациентов и пациентов с гинекологической патологией, к децидуализации, индуцированной с помощью комбинации эстрадиола с прогестероном и его новыми аналогами. Описаны методика выделения и культивирования эндометриальных клеточных линий, дана морфологическая характеристика, определены иммунофенотип, кариотип, экспрессия рецепторов прогестерона и эстрогенов. Показано, что клеточные линии, выделенные из эндометрия доноров без гинекологической патологии, подвергаются децидуальной трансформации под воздействием комбинаций эстрадиола с прогестероном и его аналогами. В то же время линии, полученные из ткани эндометрия пациентов с диагнозом эндометриоз и часть линий, выделенных из ткани эндометрия с гиперпластическими процессами, не проявили чувствительность к тем же гормонам. Полученные нами результаты подтверждают имеющиеся данные о нарушении процессов децидуализации у пациентов с эндометриозом и гиперпластическими процессами в эндометрии, а также являются предпосылкой для разработки персонализированной гестагенной терапии гинекологических заболеваний.

**Ключевые слова:** эндометрий человека, гестагены, эндометриальная клеточная линия, клеточная децидуализация, эндометриоз

**DOI:** 10.1134/S0041377119110075

Эндометрий человека обладает огромным регенеративным потенциалом. В течение репродуктивного периода женщины ткань эндометрия претерпевает регулярные циклические изменения, включающие стадии пролиферации, секреторной трансформации (децидуализации) и отторжения, которые повторяются более 400 раз. Децидуализация – важнейшая стадия подготовки эндометрия к имплантации эмбриона и развитию плаценты. В отличие от большинства млекопитающих децидуализация эндометрия человека происходит спонтанно. Она инициируется в каждом цикле, не требует имплантации эмбриона и находится под материнским контролем. Определяющим репродуктивным признаком спонтанной децидуализации является менструация – периодическое отторжение и выделение вместе с кро-

вью децидуализированного поверхностного эндометрия, происходящее в результате падения уровня прогестерона. Кроме человека, спонтанная децидуализация происходит лишь у нескольких видов млекопитающих, включая высших приматов, некоторых летучих мышей и землероек. Эти виды животных имеют и ряд других репродуктивных характеристик: спонтанную овуляцию, многократное, не ограниченное перiovуляторным периодом, спаривание, гемохориальное строение плаценты, а также рождение одного или двух хорошо развитых (зрелых) плодов за беременность (Kliman, 2000; Brosens et al., 2009; Em-era et al., 2012).

В основе децидуализации эндометрия лежит интенсивное ремоделирование тканей, во время которого стромальные фибробласты трансформируются в специализированные секреторные децидуальные клетки. Этот процесс происходит под действием стовуляторного подъема уровня прогестерона и характеризуется морфологическими, биохимическими и иммунными изменениями в эндометрии. Различные гинекологические патологии, связанные с

**Принятые сокращения:** ЭКЛ – эндометриальная клеточная линия, ПЦР – полимеразная цепная реакция, ES – эстрадиол, ESR – эстрогеновые рецепторы, PG – прогестерон, PGR – прогестероновые рецепторы, IGFBP-1 – протеин-1, связывающий инсулиноподобный фактор роста.

нарушением овуляторного цикла, прогестероновой недостаточностью, нарушением экспрессии или полиморфными вариантами рецепторов женских половых стероидных гормонов, препятствуют успешному созреванию эндометрия и его полноценной децидуализации, что может стать одной из причин развития таких социально значимых заболеваний как невынашивание беременности, аномальные маточные кровотечения, эндометриоз, бесплодие. Поэтому изучение децидуальной трансформации эндометрия человека в норме и при патологии имеет огромное значение для репродуктивной медицины, а также может стать предпосылкой для разработки персонализированной терапии гинекологических заболеваний.

Эндометрий является относительно доступной тканью, и стромальные клетки могут быть легко выделены из него и переведены в культуру. В ряде исследований было показано, что в условиях *in vitro* эндометриальные клеточные линии (ЭКЛ) человека, полученные из первичных стромальных клеток, под действием различных индукторов способны к децидуализации (Irwin et al., 1989; Tang, Gurpide, 1993; Kuroda et al., 2013; Sugawara et al., 2014). Этот процесс иллюстрирует высокую степень клеточного перепрограммирования, в результате которого изменяется морфология клеток, их иммунофенотип, экспрессия специфических маркеров и другие факторы характерные для трансформации эндометрия в секреторной фазе цикла (Kajihara et al., 2014).

Было разработано множество протоколов для индуцирования децидуализации *in vitro*, в том числе с помощью воздействия комбинации эстрадиола и прогестерона (Gellersen, Brosens, 2014). Накопленные результаты легли в основу идеи создания клеточной модели для изучения и скрининга новых аналогов прогестерона. Проведенные нами исследования показали, что клеточные линии, полученные на основе эндометрия человека, могут в условиях *in vitro* под действием композиции эстрогена с разными гестагенами трансформироваться в децидуальном направлении (Айламазян и др., 2012; Петросян и др., 2017). Однако было обнаружено, что не все ЭКЛ проявляют чувствительность к гормональному воздействию комбинации женских половых стероидных гормонов. Это согласуется с клиническими наблюдениями, когда гестагенная терапия гинекологических заболеваний в ряде случаев не дает ожидаемого эффекта и требуется замена препарата или стратегии лечения. Связано ли это с резистентностью организма к прогестерону в целом и можно ли повлиять на децидуальную реакцию с помощью аналогов прогестерона, не известно.

В связи с этим важно изучить способность ЭКЛ, полученных от пациентов с разной гинекологической патологией, включая гиперплазию эндометрия и эндометриоз, подвергаться децидуализации индуцированной комбинацией эстрадиола и с одним из

аналогов прогестерона, а также сравнить эффективность применяемых гестагенов. В развитии указанных патологий ключевую роль играет прогестерон, поэтому его аналоги часто являются препаратами выбора. Ранее в эксперименте на модельных животных нами было показано, что гестагены, превосходящие по активности прогестерон, вызывают значительно более выраженную децидуализацию эндометрия (Корхов и др., 2005; Зейналов и др., 2012). Поэтому в данном исследовании для индукции децидуализации ЭКЛ в сравнении с прогестероном были использованы его высокоактивные аналоги. Изучение восприимчивости ЭКЛ к воздействию разных прогестинов может стать основой для разработки персонализированного подхода к назначению препаратов гестагенного ряда.

Задача настоящей работы заключалась в изучении способности ЭКЛ, полученных от пациентов с гинекологической патологией и без, к децидуализации, индуцированной с помощью комбинации эстрадиола с прогестероном или его новыми аналогами.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования проведены на клеточных линиях, выделенных из образцов эндометрия матки девяти пациенток репродуктивного возраста. Биопсию эндометрия выполняли с диагностической целью путем проведения лапароскопии. Критериями включения материала в исследование являлись пациентки без гинекологической патологии, а также с такими диагнозами как гиперпластические процессы эндометрия (полипы эндометрия) и эндометриоз. Пациентки не принимали никаких гормональных препаратов в течение 3 мес до проведения исследования. От каждого донора было получено информированное добровольное письменное согласие на использование биоматериала в научных целях. Проект исследования одобрен Этическим комитетом НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта (Протокол № 77 от 12.05.2016).

**Получение ЭКЛ и культивирование.** ЭКЛ выделяли из биоптатов эндометрия ферментативным путем с использованием 0.2%-ного раствора коллагеназы II типа (Gibco, США). Раствор готовили с учетом активности фермента, указанной производителем, до конечной концентрации 150–200 ед./мл. Клетки культивировали в стандартных условиях при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в среде DMEM/F<sub>12</sub> (БиолоТ, Россия), содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки (FBS; HyClone, США) и 1% смеси антибиотиков PEST (1% пенициллина и 1% стрептомицина) (БиолоТ, Россия). Смену среды проводили каждые 2–3 сут. По достижении клетками конфлюэнтного монослоя их рассеивали в соотношении 1 : 3. Пересев проводили 1 раз в 3–4 сут с помощью смеси растворов трипсина и EDTA (1 : 3) (Sigma, США).

**Проточная цитофлуориметрия.** Иммунофенотипический анализ полученных ЭКЛ на поверхностные маркеры CD9, CD13, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, HLA I, HLA II проводили с помощью проточного цитофлуориметра Epics XL (Beckman Coulter, США), используя моноклональные антитела, меченные различными флюорохромами (FITC или фикоэритрином (PE)).

**Кариотипический анализ ЭКЛ.** При достижении 80%-ного конfluence в культуральный флакон (25 см<sup>2</sup>) добавляли раствор колхицина (0.01 мг/мл) для остановки клеточного цикла на стадии метафазы митоза. Спустя 3 ч получали суспензию клеток, которую заливали теплым (37°C) гипотоническим раствором KCl (0.55%) на 25 мин при 37°C. Действие гипотонии останавливали добавлением 100 мкл свежеприготовленного фиксатора (смесь 95%-ного этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1). Клеточный материал переносили в морозильную камеру и оставляли на 30 мин при -20°C. Смену фиксатора проводили 3 раза. Полученную клеточную суспензию раскапывали на влажные холодные предметные стекла. Для кариотипирования использовали QFН-метод дифференциального окрашивания. Для анализа метафазных пластинок использовали микроскоп Leica DMLS, камеру Leica DC 300 (Германия) и специализированное программное обеспечение для анализа изображений.

**Количественная ПЦР в реальном времени для оценки экспрессии мРНК рецепторов прогестерона (PGR) и эстрогенов (ESR).** Из ЭКЛ выделяли мРНК с помощью набора Pure Link RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Обратную транскрипцию РНК проводили с помощью набора High Capacity Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР проводили на приборе Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, США) с использованием расходных материалов производства Thermo Fisher (США) TaqMan Gene Expression Assays: Hs00174860\_m1 для гена *ESR1*, Hs01556702\_m1 для гена *PGR* и Hs00230957\_m1 для гена *ESR2*. В качестве внутреннего контроля использовали валидированные ранее гены *PUM1* и *MRPL19*. Относительный уровень экспрессии мРНК рассчитывали методом  $\Delta\Delta Ct$  с использованием программы ExpressionSuite V1.0.3. За 1 ед. принимали средний уровень экспрессии соответствующей мРНК в контрольной клеточной линии.

**Дизайн эксперимента по децидуальной трансформации ЭКЛ.** Клетки поученных линий на 4–7 пассаже пересеивали на чашки Петри и культивировали до 80%-ного конfluence. Затем клетки переводили на бессывороточную среду на 24 ч. С целью децидуальной дифференцировки ЭКЛ культивировали в среде DMEM/F<sub>12</sub>, содержащей 2% FBS, 1% PEST и комбинацию эстрадиола (ES, 10 нМ; Sigma-Aldrich, США) и прогестерона (PG, 1 мкМ; Sigma-Aldrich, США) или его новых синтетических аналогов, ис-

пользуемых в той же концентрации: PG-1 (бутират АМОЛа: 17 $\alpha$ -ацетокси-3 $\beta$ -бутаноилокси-6-метилпрегна-4,6-диен-20-он) или PG-2 (диацетат АМОЛа: 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -диацетилокси-6-метилпрегна-4,6-диен-20-он). Аналоги прогестерона синтезировали в Лаборатории биотехнологии стероидов Института биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН (Москва). Клетки культивировали в стандартных условиях. Смену среды в чашках проводили через 1, 4, 7 и 10 сут. Контрольные клетки культивировали в тех же условиях, но без добавления в среду индукторов децидуализации (гормонов). Через 14 сут эксперимент по децидуализации завершали.

**Иммуноферментный анализ для определения IGFBP-1 и пролактина (ELISA).** Количество IGFBP-1 определяли, используя набор Human IGFBP-1 ELISA Kit в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (Sigma-Aldrich, США). Количество IGFBP-1 оценивали с помощью микропланшетного фотометра Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США). Оптическую плотность раствора окрашенного продукта измеряли при 450 нм. Количество пролактина определяли с помощью хемилюминесцентного иммунного анализа с помощью парамагнитных частиц, используя Access Prolactin в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (Beckman Coulter, США). Измерения проводили с помощью компактной иммунохимической системы Access2 (Beckman Coulter, США). Данные по измерению пролактина и IGFBP-1 нормировали по количеству белка в чашке ЭКЛ при децидуализации. Белок определялся методом Бредфорда. Количество белка оценивали с помощью спектрофотометра Evolution 60 (Thermo Fisher Scientific, США).

**Статистическая обработка.** Корреляционный анализ был выполнен с использованием коэффициента корреляции Спирмена ( $r_s$ ). Применяли поправку Бенджамини–Хохберга при множественном анализе одних и тех же групп. Корреляции считали статистически значимыми при *P* близким к 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из биоптатов эндометрия 9-ти доноров были выделены 9 первичных клеточных культур: от двух пациенток без гинекологической патологии, от двух – с диагностированной гиперплазией эндометрия, от двух – с полипом эндометрия и от трех – с диагнозом эндометриоз (табл. 1). Все образцы ткани были подвергнуты гистологическим и иммуногистохимическим исследованиям для оценки состояния эндометрия и верификации экспрессии рецепторов прогестерона и эстрогена. Диагноз эндометриоз был основан на визуализации поражений при лапароскопической операции и подтвержден гистологически. В анализах пациенток инфекций мочеполовой сферы выявлено не было. Выделение первичных клеточных культур из эндометрия человека проводили согласно опи-

**Таблица 1.** Общая информация о пациентах, из эндометрия которых были выделены эндометриальные клеточные линии (ЭКЛ)

ЭКЛ	Возраст (День цикла)	Гистологическое заключение	Основной гинекологический диагноз
1	27 (7)	Гиперплазия эндометрия без атипии	Очаговая гиперплазия эндометрия
2	33 (21)	Эндометрий ранней и средней стадии фазы секреции	Без гинекологической патологии
3	38 (20)	Эндометрий со слабой пролиферацией и секреторной трансформацией желез	Без гинекологической патологии
4	26 (22)	Фиброзная ткань с эндометриоидной гетеротопией. Железистая гиперплазия эндометрия	Аденомиоз, ановуляция
5	29 (12)	Эндометрий средней стадии фазы пролиферации	Аденомиоз, киста левого яичника
6	23 (58)	Полипвидные фрагменты эндометрия пролиферативной фазы	Полип эндометрия, ановуляция, бесплодие 1 степени
7	28 (7)	Полипвидные фрагменты эндометрия пролиферативной фазы	Полип эндометрия, бесплодие 1 степени
8	48 (16)	Эндометрий поздней стадии пролиферации, ранней стадии фазы секреции. Фиброзножировая ткань с эндометриоидной гетеротопией	Эндометриоидная киста яичника, миома матки
9	36 (21)	Простая железистая гиперплазия эндометрия без атипии	Гиперплазия эндометрия

санной методике. Из каждого образца эндометрия было выделено по одной первичной клеточной культуре эндометрия. Полученные ЭКЛ были охарактеризованы по иммунофенотипу, морфологии, кариотипу, экспрессии рецепторов женских половых стероидных гормонов.

**Характеристика ЭКЛ.** Во всех полученных клеточных линиях на первых пассажах наблюдали высокий уровень морфологической гетерогенности клеток. В ЭКЛ преобладали фибробластоподобные клетки, кроме того присутствовало большое количество клеток крови, крупные округлые и отростчатые клетки. В результате многократной смены среды ко второму пассажу все ЭКЛ полностью освобождались от эритроцитов. Отростчатые и округлые клетки постепенно вытеснялись к 3–4-му пассажу фибробластоподобными клетками, т.е. гетерогенность ЭКЛ снижалась с увеличением числа пассажей (рис. 1). Все ЭКЛ, полученные в ходе данной работы, при выделении и дальнейшем культивировании прикрепля-

лись к поверхности пластика, пролиферировали и спустя несколько дней образовывали монослой.

На 5–7 пассаже все анализируемые клеточные культуры эндометрия имели преимущественно гомогенный характер, что подтверждается их иммунофенотипическим профилем. Цитометрическое фенотипирование показало, что линии, полученные от гинекологически здоровых доноров и пациенток с эндометриозом, демонстрируют положительную экспрессию поверхностных маркеров мезенхимного ряда (CD9, CD13, CD73, CD90, CD105, CD44 и HLA-I) и отсутствие экспрессии гемопоэтических и эндотелиальных маркеров CD31, CD34, CD45 и HLA-DR класса II (рис. 2). На основании полученных данных можно заключить, что из биоптатов эндометрия человека, независимо от наличия или отсутствия гинекологической патологии, была получена практически гомогенная популяция мезенхимных стромальных клеток.

**Кариотип ЭКЛ.** Изучение децидуальной трансформации ЭКЛ предполагает продолжительную ра-

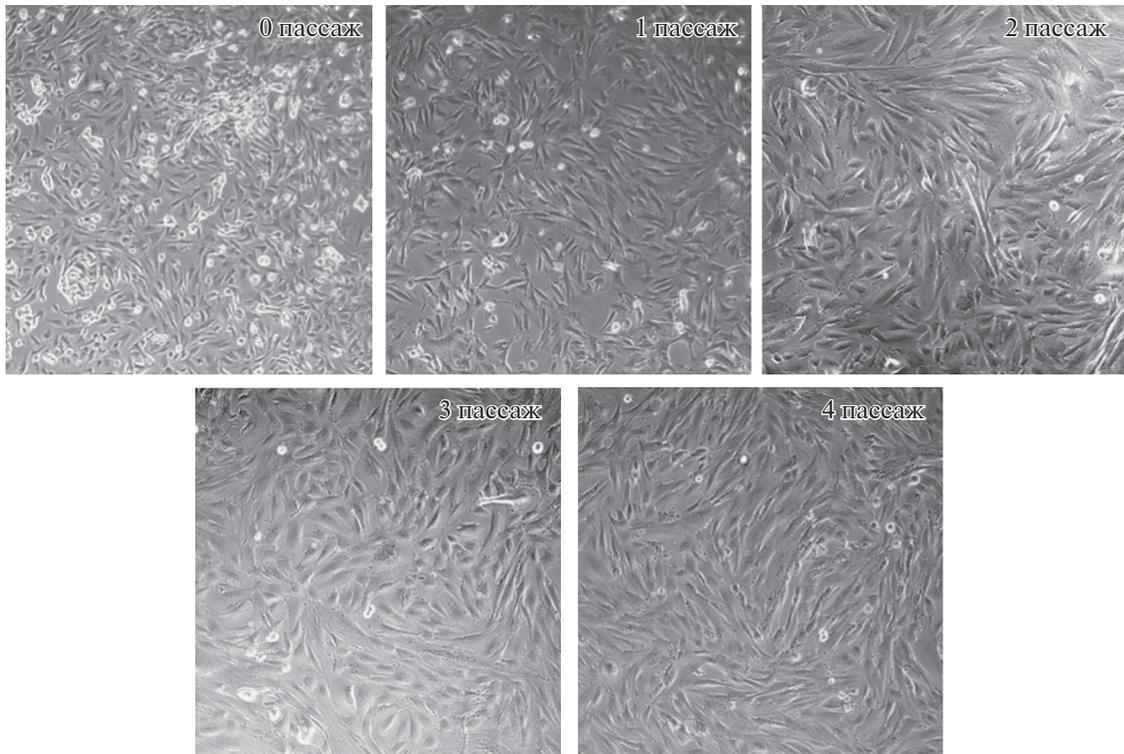


Рис. 1. Эндометриальные клетки на поверхности пластика. Пассажи 0–4. Об.: 10×.

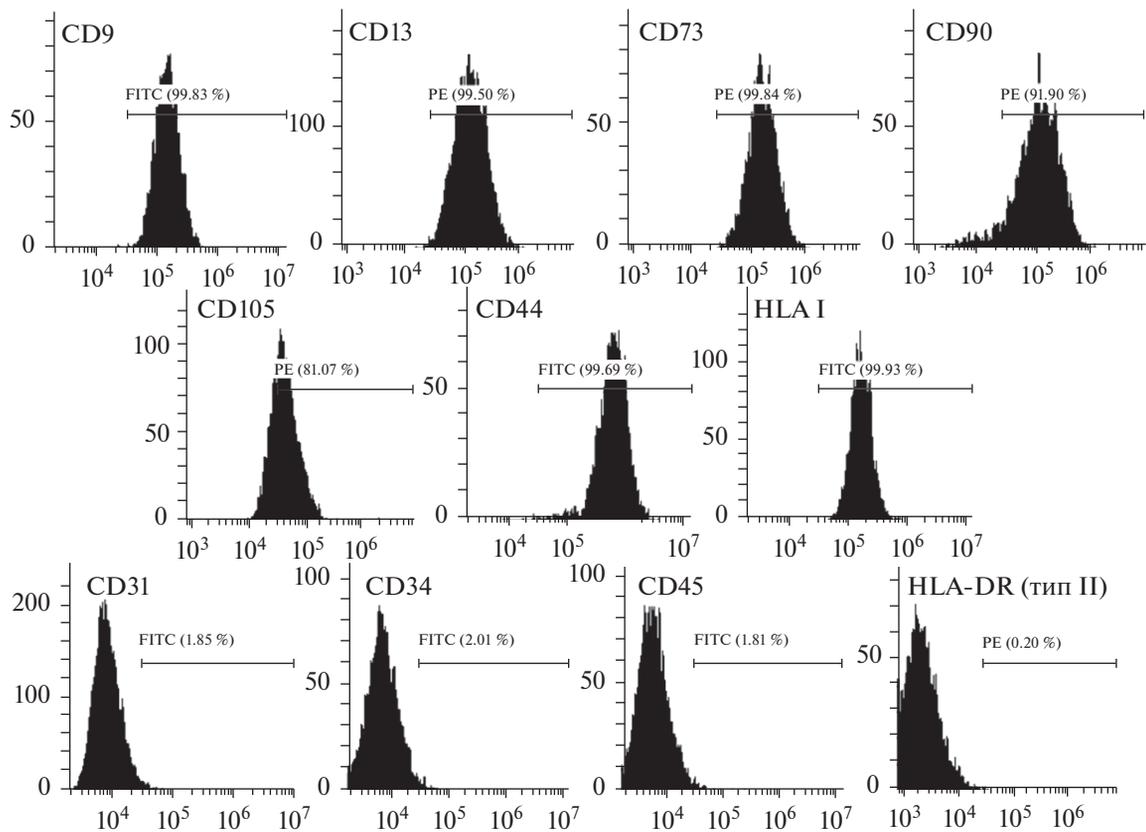
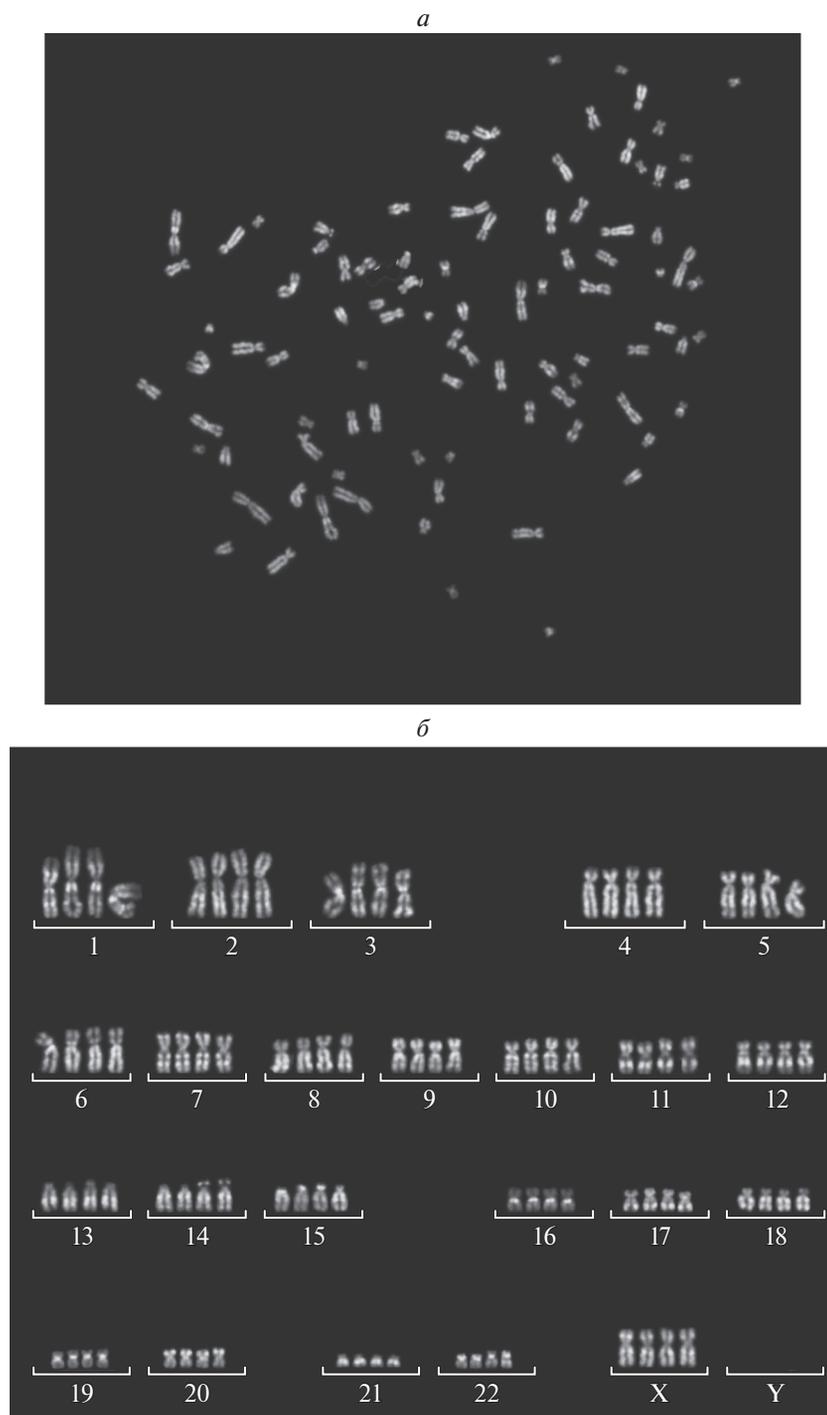


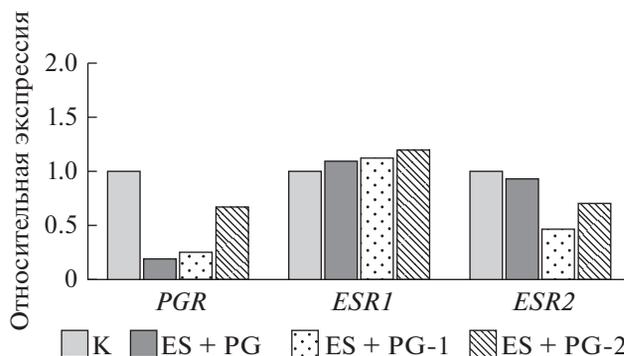
Рис. 2. Уровень экспрессии (в %) поверхностных маркеров в ЭКЛ-3 на 7-ом пассаже. Проточная флуориметрия с использованием соответствующих флуоресцентно меченных (FITC или PE) антител. Доля маркера (%) указана в скобках. По горизонтали — интенсивность флуоресценции; по вертикали — число клеток.



**Рис. 3.** Кариотип ЭКЛ-5 на 9 пассаже. Диагноз пациентки: эндометриоз. Тетраплоидия: *a* – метафазная пластинка; *б* – кариограмма (кариотип 92, XXXX). Окраска: QFН/АсD.

боту с клеточными культурами, поэтому важным условием является оценка способности ЭКЛ к быстрому делению при отсутствии канцерогенного потенциала. Все выделенные нами ЭКЛ продемонстрировали высокую скорость удвоения популяции клеток, а также отсутствие самопроизвольной диф-

ференцировки. Стабильность кариотипа всех ЭКЛ оценивали на 6–10 пассажах. Анализ проводили при достижении культурами 60–80% конfluence, т.е. до начала контактного торможения клеток. Детальный анализ показывал, что большинство проанализированных клеток имели нормальный карио-



**Рис. 4.** Экспрессия генов рецепторов эстрогена (*ESR1*, *ESR2*) и прогестерона (*PGR*) в клетках ЭКЛ-3 после совместного культивирования в течение 14 сут с эстрадиолом (ES, 10 нМ) и прогестероном (PG, 1 мкМ) или его аналогами: бутиратом (PG-1) или диацетатом (PG-2) АМОЛа в той же концентрации. За 1 ед. принимали средний уровень экспрессии соответствующей мРНК в контрольной клеточной линии.

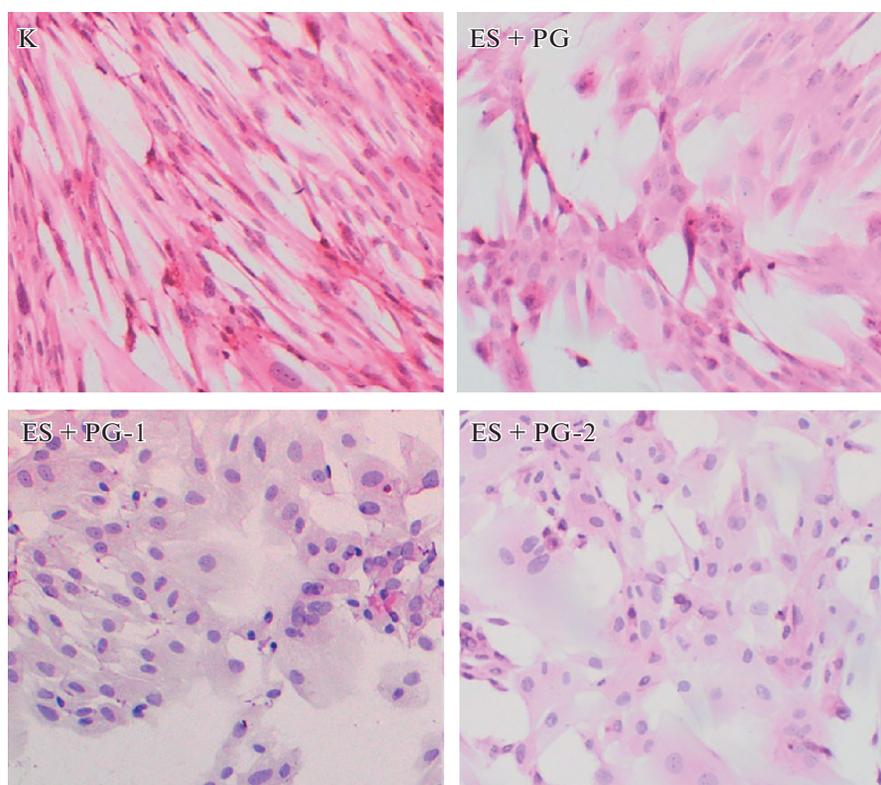
тип из 46 хромосом. Однако в ходе работы в одной из клеточных линий, выделенной из эндометрия пациентки с эндометриозом, было обнаружено отклонение числа хромосом — тетраплоидия (рис. 3). Выявленные в пределах данной клеточной популяции кариотипические изменения были неклональными и при дальнейшем культивировании не получали пролиферативного преимущества. Проанализированные данные указывают на то, что на хромосомном уровне ЭКЛ, полученные от пациентов с гинекологической патологией и без, способны к крупномасштабному расширению без мутагенеза.

**Оценка экспрессии генов эстрогеновых рецепторов (подтипов *ESR1* и *ESR2*) и прогестероновых (*PGR*) в ЭКЛ.** Использовали метод ПЦР в реальном времени. Хорошо известно, что действие стероидных препаратов опосредовано их взаимодействием со специфическими рецепторами. В нативной ткани эндометрия рецепторы к эстрогенам и прогестерону верифицируются на протяжении всего менструального цикла как в железистом, так и стромальном компоненте. Экспрессия рецепторов находится под влиянием женских половых стероидных гормонов и динамически меняется в разные стадии цикла. Перевод клеток эндометрия в систему *in vitro* лишает их гормонального контроля, в результате чего экспрессия рецепторов может быть нарушена или вовсе прекратиться. В ряде исследований было показано наличие экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону в ЭКЛ даже на больших пассажах (Brosens et al., 1999; Aghajanova et al., 2009). Мы также провели верификацию разных типов эстрогеновых и прогестероновых рецепторов во всех ЭКЛ для оценки возможности их гормональной децидуализации. Данный анализ проводился в условиях стандартного культивирования (контроль), а также в результате проведения эксперимента по децидуализации.

Во всех исследуемых ЭКЛ с 6-го по 10-й пассажи наблюдали устойчивую экспрессию мРНК рецепторов как прогестерона, так и эстрогенов обоих типов. Экспрессия рецепторов сохранялась на одном и том же уровне вплоть до 10 пассажа. Вне зависимости от диагноза донора эндометрия экспрессия мРНК рецепторов была сопоставима и значительных различий между разными линиями выявлено не было (результаты не представлены).

Чтобы оценить влияние децидуализации на изменение экспрессии генов рецепторов прогестерона и эстрогена, на одной из ЭКЛ, полученной от гинекологически здорового донора, была проведена верификация разных типов эстрогеновых и прогестероновых рецепторов после воздействия комбинации эстрадиола (10 нМ) и прогестерона (или его новых синтетических аналогов) в концентрации 1 мкМ (см. раздел “Материал и методика”). В то время как экспрессия рецепторов *ESR1* и *ESR2* сохранялась на том же уровне, экспрессия *PGR* в экспериментальных образцах, подвергнутых гормональному воздействию, была ниже, чем в контрольных клетках (рис. 4). По-видимому, это связано с активным вовлечением прогестероновых рецепторов в процесс децидуализации, в то время как эстрогеновые рецепторы в этом практически не участвуют.

**Децидуальная трансформация ЭКЛ.** Как уже упоминалось, успех наступления имплантации и дальнейшее развитие беременности во многом зависит от полноценной децидуальной трансформации эндометрия. Гиперпластические процессы в эндометрии и эндометриоз являются распространенными гинекологическими патологиями и часто ассоциированы с бесплодием. По всей вероятности, одним из объяснений этому является патологическая децидуализация. В случае гиперплазии эндометрия это не вызывает сомнений, т. к. гормональный дисбаланс, на фоне которого развивается заболевание, не



**Рис. 5.** Морфологические изменения в ЭКЛ в контроле (К) и после совместного действия эстрадиола (ES, 10 нМ) и прогестерона (PG, 1 мкМ) или его аналогов PG-1 и PG-2 в той же концентрации (1 мкМ). 14 сут культивирования. Окраска гематоксилин-эозином. Об.: 10 $\times$ .

обеспечивает полноценной секреторной трансформации эндометрия, что приводит к нарушениям менструального цикла и препятствует наступлению беременности. Также существуют убедительные доказательства, что у больных эндометриозом децидуализация стромальных клеток в значительной степени нарушена, причем как в эутопическом эндометрии, так и в эктопических поражениях (Klemmt et al., 2006; Aghajanova et al., 2010, 2011; Yang et al., 2012; Patel et al., 2017). По-видимому, совершенно иное микроокружение на эктопических участках неизменно оказывает влияние на клеточную идентичность трансплантированных стромальных клеток и, следовательно, их чувствительность к децидуогенным сигналам. Так, на моделях животных было показано, что трансплантация эутопического эндометрия в эктопический участок достаточна для индуцирования эндометриозидных поражений. При этом индукция тазового эндометриоза нарушает эутопический эндометрий. Подобным образом это происходит и у человека (Fazleabas, 2010; Han et al., 2012; Grümmer, 2013). Интересно, что эндометриальные различия между женщинами с эндометриозом и без него повторяются и даже акцентируются в первичных клеточных культурах (Aghajanova et al., 2011). Реакция

эндометрия на прогестерон, а также другие индукторы дифференцировки, включая цАМФ и хорионический гонадотропин при эндометриозе искажается, что и объясняет клиническую ассоциацию эндометриоза с неудачей имплантации и нарушением менструального цикла (Heitmann et al., 2014). Именно поэтому гестагенная терапия при эндометриозе не всегда дает ожидаемый эффект. Поэтому при отборе доноров эндометрия для изучения децидуализации были включены пациенты с эндометриозом и гиперпластическими процессами в эндометрии.

Все ЭКЛ с 4 по 12 пассаж в течение 14 сут культивировали в среде с пониженным (по сравнению со стандартными условиями культивирования) содержанием сыворотки (2% FBS) и в присутствии трех различных комбинаций гормонов: эстрадиола с прогестероном (ES + PG), эстрадиола с бутиратом АМОЛа (ES + PG-1) и эстрадиола с диацетатом АМОЛа (ES + PG-2).

Первым визуальным признаком децидуализации стромальных клеток эндометрия является изменение их морфологии. В пролиферативной фазе они имеют фибробластоподобный вид с хорошо развитым эндоплазматическим ретикуломом и аппаратом Гольджи, небольшой цитоплазмой и удлинённым ядром (Artacho-Perula et al., 1985). Децидуальная

**Таблица 2.** Значения уровней секреции маркеров децидуализации IGFBP-1 и пролактина в ЭКЛ в результате дифференцировки в децидуальном направлении под действием эстрадиола и прогестерона (ES + PG) или его аналогов (PG-1, PG-2)

ЭКЛ	Пассаж	Диагноз	Эксперим. группы	Маркер (на 1 ед клеточного белка)	
				IGFBP-1, пкг/мкг	пролактин, нг/мкг
1	4	Гиперплазия эндометрия	Контроль	0.850	0.005
			ES + PG	1.927	0.007
			ES + PG1	2.349	0.026
			ES + PG2	2.941	0.030
2	5	Без гинекологической патологии	Контроль	0.230	0.002
			ES + PG	1.489	0.002
			ES + PG1	3.721	0.019
			ES + PG2	3.402	0.016
3	6	Без гинекологической патологии	Контроль	0.049	0.001
			ES + PG	0.054	0.003
			ES + PG1	1.146	0.013
			ES + PG2	2.129	0.023
4	5	Эндометриоз	Контроль	0.139	0.002
			ES + PG	0.023	0.001
			ES + PG1	0.108	0.003
			ES + PG2	0.038	0.004
5	6	Эндометриоз	Контроль	0.087	0.003
			ES + PG	0.144	0.006
			ES + PG1	0.067	0.009
			ES + PG2	0.036	0.006
6	11	Гиперплазия эндометрия (полип)	Контроль	0.193	0.014
			ES + PG	0.179	0.017
			ES + PG1	0.586	0.041
			ES + PG2	0.248	0.014
7	5	Гиперплазия эндометрия (полип)	Контроль	1.405	0.000
			ES + PG	1.466	0.000
			ES + PG1	1.443	0.000
			ES + PG2	0.835	0.000
8	7	Эндометриоз	Контроль	0.108	0.022
			ES + PG	0.090	0.010
			ES + PG1	0.113	0.020
			ES + PG2	0.184	0.023
9	12	Гиперплазия эндометрия	Контроль	0.149	0.000
			ES + PG	0.107	0.001
			ES + PG1	0.120	0.013
			ES + PG2	0.044	0.006
Повторный эксперимент					
1	7	Гиперплазия эндометрия	контроль	0.938	0.022
			ES + PG	4.421	0.018
			ES + PG1	3.070	0.020
			ES + PG2	6.987	0.028
2	6	Без гинекологической патологии	контроль	0.123	0.021
			ES + PG	0.406	0.024
			ES + PG1	0.874	0.019
			ES + PG2	6.794	0.079
5	7	Эндометриоз	контроль	0.050	0.000
			ES + PG	0.047	0.000
			ES + PG1	0.034	0.000
			ES + PG2	0.379	0.000

Примечание. ES – эстрадиол, PG – прогестерон, PG-1 и PG-2 – аналоги PG.

трансформация, как *in vivo*, так и *in vitro*, связана с округлением ядра, увеличением числа ядрышек, дилатацией эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, а также накоплением капель гликогена и липидов в расширяющейся цитоплазме (Kajihara et al., 2014).

В процессе индуцированной нами децидуальной дифференцировки под влиянием гормонов фибробластоподобная морфология клеток также изменялась. Клетки приобретали полигональную форму, ядро укрупнялось (рис. 5). Эти морфологические изменения проявлялись не во всех клеточных культурах. В ЭКЛ-4–ЭКЛ-9 существенного изменения морфологии клеток не зафиксировано. Клетки преимущественно сохранили фибробластоподобный вид. Пролактин и протеин-1, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-1) – это установленные и теперь широко используемые маркеры децидуализации, которые мы учитывали для оценки состояния дифференцирования клеток в культуре. Полученные результаты продемонстрированы в табл. 2.

Анализ данных показал, что ЭКЛ-1–ЭКЛ-3 проявляют положительную реакцию на воздействие гормональных препаратов. В ЭКЛ-1 уровень секреции IGFBP-1 в контрольных клетках составил 0.850 пкг/мкг общего белка. На 14-е сут культивирования той же линии в среде, содержащей разные комбинации гормонов, уровень IGFBP-1 возростал. Так, в присутствии комбинации (ES + PG) содержание IGFBP-1 увеличилось в 2.3 раза. При культивировании в среде с аналогами прогестерона уровень IGFBP-1 относительно контрольной группы оказался выше в 2.7 раза для комбинации (ES + PG-1) и в 3.5 раз для комбинации (ES + PG-2). Измерение секреции второго маркера децидуализации – пролактина – показало сходные результаты. В контрольных образцах ЭКЛ-1 уровень пролактина составил 0.005 нг/мкг. Через 14 сут культивирования в присутствии комбинации гормонов его уровень изменился до 0.007, 0.026 и 0.030 нг/мкг в случае PG, PG-1 и PG-2 соответственно.

Аналогичные результаты были получены для ЭКЛ-2 и ЭКЛ-3, у которых секреция исследуемых маркеров после действия гормонов возросла в десятки раз по сравнению с контролем. Так, уровень секреции пролактина в ЭКЛ-2, подвергшейся воздействию аналогов прогестерона, увеличился в 8–10 раз, а IGFBP-1 – в 14–16 раз (табл. 2). В контрольных клетках ЭКЛ-3 секреция IGFBP-1 составила 0.049 пкг/мкг, а после воздействия комбинации ES + PG-1 и ES + PG-2 – 1.146 и 2.129 пкг/мкг соответственно. Таким образом, под воздействием аналогов прогестерона уровень секреции IGFBP-1 вырос в 23 и 43 раза соответственно. Секреция пролактина в

этой линии увеличилась в 13 раз для комбинации ES + PG-1 и в 23 раза для комбинации ES + PG-2. При этом на фоне прогестерона секреция IGFBP-1 и пролактина для ЭКЛ-2 и ЭКЛ-3 выросла незначительно.

Остальные ЭКЛ показали отсутствие или слабую реакцию на воздействие гормональных препаратов. С помощью иммуноферментного анализа было установлено, что уровень секреции IGFBP-1 и пролактина в этих ЭКЛ практически не изменился.

На трех ЭКЛ, полученных от одного донора без гинекологической патологии и двух пациентов с разной патологией, для оценки воспроизводимости результатов был проведен повторный эксперимент, в который были отобраны ЭКЛ-1 (пациентка с гиперплазией эндометрия), ЭКЛ-2 (донор без гинекологической патологии) и ЭКЛ-5 (пациентка с эндометриозом). Результаты исследования были аналогичны полученным ранее (табл. 2).

Таким образом, под действием комбинации гормонов децидуальной трансформации подверглись 2 линии, полученные от доноров без гинекологической патологии (ЭКЛ-2 и ЭКЛ-3). Также успешно трансформировалась одна из линий, полученная от пациентки с гиперплазией эндометрия (ЭКЛ-1). Причем во всех линиях отмечали более выраженную реакцию на аналоги прогестерона, чем на сам прогестерон.

Линии, полученные от пациентов с эндометриозом, по анализируемым нами маркерам, показали слабую избирательную реакцию на действие прогестерона и его аналогов или полное ее отсутствие. Полученные результаты подтверждают мнения, что при эндометриозной болезни децидуальная реакция эндометрия часто имеет искаженный характер. Как отмечают многие исследователи, эутопический эндометрий пациенток с эндометриозом характеризуется многочисленными клеточными и биохимическими изменениями (Brosens et al., 2012; Lessey et al., 2013; Venagiano et al., 2014). Какие именно факторы влияют на децидуализацию еще предстоит установить. Однако нет сомнений в их важной роли в наступлении и развитии беременности.

В случае гиперпластических процессов в эндометрии одна из линий показала способность к трансформации под действием комбинации эстрадиола как с прогестероном, так и с его аналогами. Причем на фоне аналогов прогестерона содержание маркеров децидуализации значительно возросло аналогично результатам, полученным на ЭКЛ гинекологически здоровых доноров. Остальные линии, полученные от пациентов с гиперпластическими процессами в эндометрии, не трансформировались под действием гормонов. При этом в случае отсут-

ствия реакции на прогестерон, клетки также не отвечали и на воздействие его аналогов. Выявлена корреляция между эффектами PG и PG-1 на уровень IGFBP-1 ( $r_s = 0.8$ ,  $P = 0.0138$  без поправки и  $0.055$  с поправкой на множественный анализ) и на уровень пролактина ( $r_s = 0.73$ ,  $P = 0.03$  без поправки или  $0.062$  с поправкой на множественный анализ). Значимые корреляции между эффектами PG-2 и PG выявлены не были.

Стоит отметить, что исследование было проведено на ограниченном числе пациентов и нуждается в увеличении числа клеточных линий эндометрия как доноров без гинекологической патологии, так и с гинекологическими заболеваниями для расширений знаний о децидуализации в норме и при патологии, а также для поиска ее эффективных индукторов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, несмотря на стандартные условия выделения и культивирования ЭКЛ, одинаковый иммунофенотипический профиль, стабильный кариотип и наличие стабильной экспрессии рецепторов прогестерона и эстрогенов не все ЭКЛ способны подвергаться децидуальной трансформации под воздействием гормональных индукторов. В результате проведенного исследования, было продемонстрировано, что клеточные линии, выделенные из эндометрия гинекологически здоровых доноров, способны подвергаться комбинированному воздействию эстрадиола и прогестерона или его аналогов. В результате трансформации изменяется клеточная морфология ЭКЛ и увеличивается экспрессия маркеров децидуализации, причем под действием высокоактивных аналогов прогестерона значительно больше, чем при индукции прогестероном. Клеточные линии, полученные из ткани эндометрия пациентов с диагнозом эндометриоз, не проявили чувствительности к тем же гормонам. Среди ЭКЛ, выделенных из ткани эндометрия с гиперпластическими процессами, также часть линий оказалась индифферентной к гормональной индукции. Полученные нами результаты подтверждают имеющиеся данные о нарушении процессов децидуализации у пациентов с эндометриозом и гиперпластическими процессами в эндометрии.

Между тем стоит отметить, что эндометрий человека обладает огромной пластичностью. По всей вероятности, стволовые клетки, вовлеченные в процесс регенерации эндометрия, могут запустить программу клеточной децидуализации как спонтанно, так и под действием фармакологических агентов, при выборе которых целесообразно учитывать их эффективность в тестах *in vitro*.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.В. Зенину за проведение иммунофенотипического анализа ЭКЛ и врачу акушеру-гинекологу к. м. н. Т.М. Лекаревой за консультативную помощь.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-015-00449), а также при частичной поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках фундаментального исследования по теме: “Разработка стратегий диагностики, терапии генитального эндометриоза и опухолей женского репродуктивного тракта” (регистрационный номер: АААА-А19-119030490009-6).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

От каждого донора было получено информированное добровольное письменное согласие на использование биоматериала в научных целях. Проект исследования одобрен Этическим комитетом НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта (Протокол № 77 от 12.05.2016).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Айламазян Э.К., Петросян М.А., Толибова Г.Х., Крылова Т.А., Горячая Т.С., Петрова Л.И., Дурнова А.О., Полякова В.О., Кветной И.М.* 2012. Культура эндометрия человека: модель изучения репродуктивной функции. Мед. академ. журн. 12(1) : 28–35. (*Aylamazyan E.K., Petrosyan M.A., Tolibova G.Kh., Krylova T.A., Goryachaya T.S., Petrova L.I., Durnova A.O., Polyakova V.O., Kvetnoy I. .M.* 2012. Human endometrial culture: A model for the study of reproductive function. Med. Acad. J. 12(1) : 28–35.)
- Зейналов О.А., Ядерец В.В., Стыщенко Т.С., Петросян М.А., Андриюшина В.А.* 2012. Синтез и биологическая активность синтетических производных  $17\alpha$ -гидроксипрогестерона. Химико-фармацевтический журнал. 46(4) : 7–10. (*Zeynalov O.A., Yaderets V.V., Stytsenko T.S., Petrosyan M.A., Andryushin V.A.* 2012. Synthesis and biological activity of synthetic derivatives of  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone. Chem. Pharm. J. 46(4) : 7–10.)
- Корхов В.В., Лесик Е.А., Петросян М.А.* 2005. Исследование гестагенной и контрацептивной активности синтетических аналогов прогестерона в эксперименте. Экспер. клин. фармакол. 68(1) : 39–41. (*Korhov V.V., Lesik E.A., Petrosyan M.A.* 2005. Investigation of the gestagenic and contraceptive activity of synthetic progesterone analogues in the experiment. Exper. Clinical Pharmacol. 68(1) : 39–41.)
- Петросян М.А., Мележниковна Н.О., Домнина А.П., Андриюшина В.А., Горячая Т.С., Петрова Л.И., Малышева О.В.,*

- Разыграев А.В., Полякова В.О., Сапронов Н.С.* 2017. Поиск новой клеточной модели для изучения фармакологической активности аналогов прогестерона. Цитология. 59(10) : 676–684. (*Petrosyan M.A., Melezhnikova N.O., Domnina A.P., Andryushin V.A., Goryachaya T.S., Petrova L.I., Malysheva O.V., Razygraev A.V., Polyakova V.O., Sapronov N.S.* 2017. Search for a new cell model to study the pharmacological activity of progesterone analogues. Tsitologiya. 59(10) : 676–684.)
- Aghajanova L., Hamilton A., Kwintkiewicz J., Vo K.C., Giudice L.C.* 2009. Steroidogenic enzyme and key decidualization marker dysregulation in endometrial stromal cells from women with versus without endometriosis. Biol. Reprod. 80(1) : 105–14.
- Aghajanova L., Horcajadas J.A., Weeks J.L., Esteban F.J., Nezhat C.N., Conti M., Giudice L.C.* 2010. The protein kinase A pathway-regulated transcriptome of endometrial stromal fibroblasts reveals compromised differentiation and persistent proliferative potential in endometriosis. Endocrinol. 151(3) : 1341–1355.
- Aghajanova L., Tatsumi K., Horcajadas J.A., Zamah A.M., Esteban F.J., Herndon C.N., Conti M., Giudice L.C.* 2011. Unique transcriptome, pathways, and networks in the human endometrial fibroblast response to progesterone in endometriosis. Biol. of Reproduct. 84(4) : 801–815.
- Artacho-Perula E., Roland-Villalobos R., Roldan-Villalobos A., Salas-Molina J., Vaamonde-Cornillie F.J., Lauweryns J.M., Brosens I.A.* 1985. Normal human endometrium: An ultrastructural survey. Gynecol. Obstet. Invest. 20 : 113–129.
- Benagiano G., Brosens I., Habiba M.* 2014. Structural and molecular features of the endomyometrium in endometriosis and adenomyosis. Hum. Reprod. Update. 20 : 386–402.
- Brosens I., Brosens J.J., Benagiano G.* 2012. The eutopic endometrium in endometriosis: Are the changes of clinical significance? Reprod. Biomed. Online. 24 : 496–502.
- Brosens J.J., Hayashi N., White J.O.* 1999. Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. Endocrinol. 140(10) : 4809–4820.
- Brosens J.J., Parker M.G., McIndoe A., Pijnenborg R., Brosens I.A.* 2009. A role for menstruation in preconditioning the uterus for successful pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 200 : 615.e1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.11.037>
- Emera D., Romero R., Wagner G.* 2012. The evolution of menstruation: A new model for genetic assimilation: explaining molecular origins of maternal responses to fetal invasiveness. Bioessays. 34 : 26–35.
- Fazleabas A.T.* 2010. Progesterone resistance in a baboon model of endometriosis. Seminars Reproduct. Med. 28 : 75–80.
- Gellersen B., Brosens J.J.* 2014. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. Endocrine Rev. 35 : 851–905.
- Grümmer R.* 2013. Translational animal models to study endometriosis-associated infertility. Seminars Reprod. Med. 31 : 125–132.
- Han S.J., Hawkins S.M., Begum K., Jung S.Y., Kovanci E., Qin J., Lydon J.P., DeMayo F.J., O'malley B.W.* 2012. A new isoform of steroid receptor coactivator-1 is crucial for pathogenic progression of endometriosis. Nature Med. 18 : 1102–1111.
- Heitmann R.J., Langan K.L., Huang R.R., Chow G.E., Burney R.O.* 2014. Premenstrual spotting of  $\geq 2$  days is strongly associated with histologically confirmed endometriosis in women with infertility. Am. J. Obstetrics Gynecol. 211 : 358.e1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.04.041>
- Irwin J.C., Kirk D., King R.J., Quigley M.M., Gwatkin R.B.* 1989. Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: An in vitro model for decidualization. Fertil. Steril. 52 : 761–768.
- Kajihara T., Tanaka K., Oguro T., Tochigi H., Prechapanich J., Uchino S., Itakura A., Šučurović S., Murakami K., Brosens J.J., Ishihara O.* 2014. Androgens modulate the morphological characteristics of human endometrial stromal cells decidualized *in vitro*. Reproduct. Sci. 21 : 372–380.
- Klemmt P.A., Carver J.G., Kennedy S.H., Koninckx P.R., Mardon H.J.* 2006. Stromal cells from endometriotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity. Fertil. Steril. 85 : 564–572.
- Kliman H.J.* 2000. Uteroplacental blood flow: The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion. Am. J. Ppathol. 157 : 1759–1768.
- Kuroda K., Venkatakrishnan R., Salker M.S., Lucas E.S., Sheheen F., Kuroda M., Blanks A., Christian M., Quenby S., Brosens J.J.* 2013. Induction of 11 $\beta$ -HSD 1 and activation of distinct mineralocorticoid receptor-and glucocorticoid receptor-dependent gene networks in decidualizing human endometrial stromal cells. Mol. Endocrinol. 27 : 192–202.
- Lessey B.A., Lebovic D.I., Taylor R.N.* 2013. Eutopic endometrium in women with endometriosis: Ground zero for the study of implantation defects. Seminars Reproduct. Med. 31 : 109–124.
- Patel B.G., Rudnicki M., Yu J., Shu Y., Taylor R.N.* 2017. Progesterone resistance in endometriosis: Origins, consequences and interventions. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 96 : 623–632.
- Sugawara K., Hamatani T., Yamada M., Ogawa S., Kamijo S., Kuji N., Akutsu H., Miyado K., Yoshimura Y., Umezawa A.* 2014. Derivation of human decidua-like cells from amnion and menstrual blood. Sci. Reports. 4. Article number: 4599. <https://doi.org/10.1038/srep04599>
- Tang B., Gursipide E.* 1993. Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stromal cells. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 47 : 115–121.
- Yang H., Zhou Y., Edelshein B., Schatz F., Lockwood C.J., Taylor H.S.* 2012. FKBP4 is regulated by HOXA10 during decidualization and in endometriosis. Reproduct. 143 : 531–538.

## DECIDUAL DIFFERENTIATION OF ENDOMETRIAL CELL LINES IN NORMAL AND PATHOLOGY

M. A. Petrosyan<sup>a, \*</sup>, N. O. Melezhnikova<sup>a</sup>, A. P. Domnina<sup>b</sup>, O. V. Malysheva<sup>a</sup>, N. Yu. Shved<sup>a</sup>, L. I. Petrova<sup>a</sup>,  
L. S. Polyanskikh<sup>a</sup>, E. V. Baziyan<sup>a</sup>, and A. S. Molotkov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Otto Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, 199034 Russia*

<sup>b</sup>*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia*

*\*e-mail: mariya@labpharm.spb.ru*

The paper is devoted to the study of decidualization of endometrial cell lines induced by a combination of estradiol with progesterone and its new analogues. Cell lines were isolated from the endometrium of gynecologically healthy patients and patients with gynecological pathology. The technique of isolation and cultivation of endometrial cell lines and their morphological characteristics is described. We determined the immunophenotype, karyotype of cell lines and evaluated the expression of progesterone and estrogen receptors. In addition, we showed that cell lines isolated from the endometrium of gynecologically healthy donors demonstrated decidual transformation by the effect of a combination of estradiol and progesterone (or its analogues). However, the lines obtained from endometrial tissue of patients diagnosed with endometriosis and some of the lines isolated from endometrial tissue with hyperplastic processes did not show sensitivity to the same hormones. Our results confirm the available data on the violation of decidualization processes in patients with endometriosis and endometrial hyperplastic processes. The data obtained are a prerequisite for development of personalized gestagen gynecological diseases therapy.

**Keywords:** human endometrium, gestagens, endometrial cell line, cell decidualization, endometriosis