

УДК 576.08

3D-КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ: ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ

© 2020 г. А. О. Дробинцева^{1, 2}, А. С. Аверкиева³, М. А. Петросян^{4, 5, *},
А. П. Домнина⁶, И. М. Кветной^{2, 7}, В. О. Полякова^{1, 2}

¹Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, 194100 Россия

²Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, 191036 Россия

³Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технологический университет),
Санкт-Петербург, 190013 Россия

⁴Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта,
Санкт-Петербург, 199034 Россия

⁵Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, 194156 Россия

⁶Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

⁷Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

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

Поступила в редакцию 03.05.2020 г.

После доработки 17.05.2020 г.

Принята к публикации 18.05.2020 г.

Представлен обзор, посвященный культивированию клеток, выделенных из эндометрия, в 3D-моделях. Описаны различные методики 3D-культивирования клеток эндометрия, представлены их характеристики, а также применение 3D-культур в сфере биомедицинских исследований. Рассматриваются возможности использования 3D-культур для изучения патогенеза и разработки методов терапии таких заболеваний, как рак эндометрия и эндометриоз, анализируются результаты исследований, связанные с децидуализацией эндометрия и имплантацией бластоцисты в 3D-системах.

Ключевые слова: 3D-культивирование, эндометрий, децидуализация, ЭКО, эндометриоз, рак эндометрия

DOI: 10.31857/S0041377120080027

До недавнего времени большинство исследований на клеточных культурах эндометрия человека проводили в монослое клеток, т.е. в двухмерной (2D) модели. В Российской Федерации клеточная культура эндометриальных мезенхимных стволовых клеток впервые была получена из менструальной крови в 2008 году в Национальном медицинском исследовательском центре акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова совместно с Институтом молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (Мусина и др., 2008), а в 2012 г. эндометриальные клеточные линии были получены из биоптатов эндометрия пациенток НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта (Айламазян и др., 2012). Клеточные культуры эндометрия рассматриваются как перспективный источник стволовых клеток для регенеративной медицины, а

также в качестве клеточной модели для изучения репродуктивной функции человека, тестирования новых аналогов женских половых стероидных гормонов и персонализированной терапии гинекологических заболеваний (Земелько и др., 2011; Домнина и др., 2013; Петросян и др., 2017, 2019).

С развитием клеточных технологий появилась возможность трехмерного культивирования (3D). Растущие в 2D-условиях клетки обычно более плоские и вытянутые по сравнению с клетками организма и трехмерных культур. Установлено, что в 2D- и 3D-культурах профили экспрессии генов (особенно вовлеченных в регуляцию пролиферации, дифференцировки и апоптоза) различаются (Edmondson et al., 2014).

3D-модель характеризуется естественным ростом клеток в трехмерном измерении, при котором сохраняются межклеточные взаимодействия, контакты с внеклеточным матриксом и микросредой. Для эпителиальных клеток эндометрия трехмерное окружение имеет большое значение, так как характерная для них поляриность создается благодаря специфиче-

Принятые сокращения: СКЭ — стромальные клетки эндометрия; ХГЧ — хорионический гонадотропин человека; ЭКЛ — эндометриальные клеточные линии; ЭКО — экстракорпоральное оплодотворение; ЭКЭ — эпителиальные клетки эндометрия; ЭМСК — мезенхимные стволовые клетки эндометрия.

ским межклеточным контактам и поддерживается за счет взаимодействия с базальной мембраной и внеклеточным матриксом. 3D-культуры на основе клеток эндометрия могут использоваться для изучения взаимодействия с патогенными бактериями, для моделирования эндометриоза, воздействия лекарственных препаратов на эндометриальные клетки, моделирования процессов децидуализации и имплантации.

Представленный обзор на примере клеток эндометрия рассматривает основные принципы создания 3D-моделей, их отличия от 2D-культур, а также показывает широкие возможности использования 3D-моделей в биомедицинских исследованиях, направленных на изучение проблем репродукции человека.

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ 3D-КУЛЬТУР ЭНДОМЕТРИЯ

В отличие от гомогенных 2D-моделей, создание 3D-моделей является более сложным и трудоемким процессом. Применение 3D-модельных систем позволяет исследовать ряд процессов, изучение которых было возможно лишь на живых организмах, в первую очередь на экспериментальных животных.

К определенным недостаткам 3D-культуры следует отнести длительное время формирования такой структуры (20–30 сут), трудоемкость процесса и невысокую производительность, а также сложность визуализации клеток внутри модельной системы и применения нерутинных методических приемов, которые необходимы для исследования морфологии клеток, приготовления гистологических препаратов и их окрашивания. С последней проблемой можно справиться, используя конфокальную лазерную сканирующую флуоресцентную микроскопию, которая позволяет анализировать клетки в трехмерных условиях (Дурнова и др., 2014).

Для создания 3D-клеточной системы, помимо клеток, необходимо подобрать носитель (внеклеточный матрикс, скаффолд) к которому клетки прикрепляются, или в который будут погружены. Этот носитель должен имитировать естественные условия для клеток. В качестве внеклеточного матрикса можно использовать различные материалы, как натуральные (коллаген, фибрин, гиалуроновую кислоту, хитозан, алгинат), так и синтетические (полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт) (Мингалева и др., 2013). Натуральные матриксы обладают необходимой биоактивностью, но их нельзя стандартизировать и сложно определить их биологическое влияние на клеточную культуру. Синтетические матриксы, с одной стороны, обладают нейтральным составом, что дает возможность стандартизировать параметры культивирования. С другой стороны, они не позволяют клеткам реализовать межклеточное взаимодей-

ствие в связи с отсутствием внеклеточных сигнальных молекул.

Чаше всего предпочтение отдают биоматриксу Матригелю — препарату, выделенному из базальной мембраны клеток саркомы мыши линии Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), содержащий различные компоненты внеклеточного матрикса (ламинин, коллаген IV типа, энтактин, гепарансульфат-протеогликан) (Kibbey, 1994). В зависимости от цели эксперимента, возможно использование двух типов Матригеля — включающих факторы роста (basement membrane matrix) или без них (growth factors reduced matrigel). Например, при исследовании влияния вводимого компонента необходимо использовать Матригель без факторов роста, чтобы исключить их совместное воздействие (Семина и др., 2016).

3D-культуры, содержащие как стромальные клетки эндометрия (СКЭ), так и эпителиальные клетки эндометрия (ЭКЭ) начали получать в конце 90-х гг. XX в. Обобщенный протокол получения 3D-культуры выглядит следующим образом. Клетки выделяют из биопсии эндометрия здоровых женщин (с регулярным менструальным циклом), полученной в периоды ранней и средней пролиферативной фазы цикла. Клетки получают методом ферментативной диссоциации измельченных кусочков ткани с последующей фильтрацией. Затем СКЭ помещают в матрикс (бычий коллаген (Bentin-Ley et al., 1994) или фибрин из плазмы крови человека с агарозой (Wang et al., 2012), дают матриксу застыть и высеивают на него эпителиальные железы целиком (Bentin-Ley et al., 1994) или ЭКЭ, полученные также с помощью ферментативной диссоциации (Wang et al., 2012). Культивирование проводят на вставках в планшете в среде с сывороткой животных или в бессывороточной среде с добавлением факторов роста, инсулина и трансферрина.

На трехмерной модели было установлено (Yang et al., 2002), что ЭКЭ иммунопозитивны к следующим антителам: цитокератину, интегринам ($\alpha 1$, $\alpha 4$ и $\beta 3$), циклооксигеназе (COX-1 и COX-2), матриксной металлопротеиназе (1, 2, 3 и 9), тканевому ингибитору металлопротеиназ (TIMP-1 и TIMP-2). Этот же факт справедлив для ЭКЭ *in vivo* (Yang et al., 2002). В некоторых СКЭ также были идентифицированы интегрины, циклооксигеназы и матриксные металлопротеиназы.

Кроме нормального эндометрия, для создания 3D-моделей можно использовать эндометрии из эндометриоидных гетеротопий, что позволяет изучить патогенез этого заболевания в условиях, приближенных к *in vivo*. В одной из работ были выделены и культивированы ЭКЭ от 34-летней пациентки с диагнозом эндометриоз яичников и от пациентки с перитонеальным эндометриозом (Brueggmann et al., 2014). В этой работе авторы покрывали поверхность чашек Петри 1.5%-ным гидрофильным веществом полигидроксиэтилметакрилатом (polyHEMA; Sig-

ма, США), которое препятствует клеточной адгезии к подложке, поэтому сфероиды – клеточные агрегаты эпителиальных клеток – формировались самостоятельно. При анализе экспрессии генов, связанных с эндометриозом, обнаружили, что в условиях 3D-культивирования первичные клеточные линии ЭКЭ, полученные от пациенток с эндометриозом, отличаются от монослойных культур и более точно имитируют молекулярные и гистологические особенности эндометриоидных гетеротопий.

Для создания 3D-моделей эндометрия используются не только первичные клеточные линии, но также перевиваемые линии опухолевых клеток. Так, для изучения взаимодействия эпителия матки с комменсальными и патогенными бактериями влагалища (*Lactobacillus crispatus*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*) использовали линию клеток высокодифференцированной аденокарциномы эндометрия человека HEC-1A (Łaniewski et al., 2017). Авторы выращивали клетки HEC-1A на покрытых коллагеном пористых микроносителях (Cytodex-3) в системе вращающейся клеточной культуры (RWV; биореактор Synthecon). В начале ЭКЭ выращивали в виде монослоя во флаконе, затем клетки снимали с подложки и клеточную суспензию смешивали с микроносителями и переносили в биореактор. Через 21 сут ЭКЭ полностью покрывали микроносители.

Исследование морфологической характеристики трехмерных культур выполняли с помощью сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии. Было установлено, что клетки HEC-1A в 3D-культуре росли как один слой и по морфологическим характеристикам напоминали клетки эндометрия в ранней пролиферативной фазе менструального цикла. Клетки имели выпуклую апикальную форму с варьирующим количеством пиноподий. Кроме того, ЭКЭ, выращенные в 3D-системах, имели десмосомы и активно секретируют муцины, что характерно для ткани *in vivo*. Экспериментально показано, что в ответ на заражение патогенными бактериями *Neisseria gonorrhoeae* ЭКЭ в 3D-культуре выделяют провоспалительные цитокины и хемокины (Łaniewski et al., 2017).

При образовании железы между эпителиальными клетками возникает центральный просвет. С помощью 3D-модели было показано, что сигнальный путь ERK/MAPK играет важную роль в формировании этого просвета (Eritja et al., 2012). Авторы этой работы обнаружили, что добавление глюкокортикоидов вызывает образование нескольких просветов в одной железе. Так как глюкокортикоиды угнетают высвобождение цитокинов, в 3D-модели культивирования было проведено исследование влияния провоспалительных цитокинов интерлейкина-1 α (IL1 α) и фактора некроза опухоли- α (TNF α) на полярность эпителиальных клеток и просвет желез. Была определена новая функция для цитокинов IL1 α и TNF α , а именно участие в образовании и

поддержании единственного центрального просвета, при этом показано, что эффект цитокинов регулируется сигнальным путем ERK/MAPK; кроме того, показано, что эстрогеновый рецептор участвует в регуляции их экспрессии (Eritja et al., 2012).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ 3D-КУЛЬТУРЫ ЭНДОМЕТРИЯ В БИОМЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЯХ

Менструальный цикл встречается только у человека и некоторых видов высших приматов, что ограничивает использование моделей грызунов для изучения физиологических и фармакологических аспектов физиологии эндометрия и ставит вопрос о необходимости разработки систем *in vitro*. Эпителиальные и стромальные клетки могут быть легко выделены из биоптатов ткани эндометрия и переведены в культуру.

В ряде исследований было показано, что в условиях 2D-культивирования 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). Было разработано множество протоколов для индуцирования децидуализации, в том числе с помощью воздействия экзогенных аналогов цАМФ, комбинации эстрадиола и прогестерона, а также его аналогов, хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) и других индукторов (Gellersen, Brosens, 2014).

В исследованиях группы австралийских ученых под руководством Okada (Okada et al., 2005) мезенхимные стволовые клетки эндометрия (эмСК) культивировали в монослое под воздействием эстрадиола и прогестерона в течение 12 сут, в результате чего клетки изменяли свою морфологию и демонстрировали увеличение экспрессии децидуальных маркеров – пролактина и протеина-1, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-1). Увеличение экспрессии цАМФ было обнаружено при культивировании эндометрия с релаксином, кортикотропин-рилизинг-фактором или простагландином E₂, которые вызвали накопление внутриклеточного цАМФ (Kajihara et al., 2013). Децидуализацию эмСК также возможно стимулировать *in vitro* в течение короткого временного интервала (3 сут) путем активации цАМФ-пути, зависящего от протеинкиназы A (Земелько и др., 2011). В этом случае уровни экспрессии пролактина и IGFBP-1 возрастают гораздо больше, чем при культивировании с половыми стероидными гормонами. Тем не менее, некоторые исследования показали, что часть генов в ЭКЛ специфически активируются прогестероном, но не цАМФ (Shindoh et al., 2014). Идентификация экспрессии генов в ЭКЛ, которые индуцируются специфическими гормонами, дает представление о молекулярных событиях, лежащих в основе их разнообразных и тканеспецифичных действий.

Таким образом, ЭКЛ показали себя как отличная *in vitro* модель для изучения изменения экспрессии белков-маркеров децидуализации, важных для репродуктивной функции эндометрия. Трансформированные в условиях *in vitro* ЭМСК дали представления об экспрессии таких белков как Нох-A10, FOXO1, Hand2 и других (Pawar et al., 2014). Так, например, в недавних сообщениях упоминалось об увеличении экспрессии РНК-мессенджера Hand2 в зависимости от времени культивирования и концентрации прогестина в процессе децидуализации ЭКЛ человека (Li et al., 2011). В другом эксперименте было показано, что небольшое интерферирующее РНК-опосредованное отключение экспрессии Hand2 в ЭКЛ во время прогестин-индуцированной децидуализации ослабляет клеточную дифференциацию, снижает секрецию специфических факторов децидуализации, включая пролактин и фибулин-1, а также экспрессию ядерного белка FOXO1 (Okada et al., 2018).

Моделирование и изучение процесса децидуализации на монослойных культурах эндометрия было информативно. Оно позволило выявить сигнальные пути (цепь молекул, ведущих к факторам транскрипции) в ответ на действие гормонов, факторов роста и цитокинов, индуцирующих децидуализацию. Однако такие модели не могут быть использованы для изучения сложных межклеточных взаимодействий или тканевого ремоделирования и инвазии. Для этих целей были разработаны и использовались наиболее приближенные к реальной физиологии 3D-модели (Kim et al., 2005; Sengupta et al., 2008; Meng et al., 2009; Wang et al., 2013). С их помощью удобно имитировать секреторную и менструальную фазы цикла. В них можно наблюдать более тонкие морфологические изменения, а также экспрессию децидуальных и ангиогенных белков. Такие модели могут быть использованы для изучения и выбора терапии синдрома Ашермана, восстановления дефектов после удалений лейомиомы, а также являются полезным инструментом для изучения восприимчивости трофобласта и имплантации бластоцисты (Schutte, Taylor, 2012).

Для исследований, связанных с патогенезом рака эндометрия, 3D-культивирование дает более эффективную рабочую площадку, чем 2D-культивирование. Трехмерная модель с первичными клетками эндометрия мыши, состоящая из бессывороточной среды (DMEM/F12) и 3%-ного Матригеля, включающая инсулин и эпидермальный фактор роста, позволила воссоздать железы в модельной ткани, аналогичные железам *in vivo* (один слой ЭКЭ, имеющих клеточную полярность, с просветом внутри), поскольку данная модель способна поддерживать характерную апико-базальную клеточную полярность и межклеточную адгезию (Eritja et al., 2010).

Для того, чтобы подтвердить эффективность своей 3D-модели для изучения канцерогенеза эндометрия, в одной из работ авторы (Eritja et al., 2010) исследовали, как влияет подавление генов *CDH1* и

PTEN на образование желез в тканевой модели. Выбор генов был связан с тем, что при канцерогенезе эндометрия часто наблюдается ингибирование экспрессии гена *CDH1*, отвечающего за образование белка Е-кадгерина, определяющего межклеточные контакты, и гена *PTEN*, продуктом которого является фосфатаза, регулирующая деление клеток. Для подавления генов использовали лентивирусы, несущие шпилечные РНК (E-cadherin-shRNA, PTEN-shRNA). При ингибировании экспрессии гена *CDH1* железы в модельной ткани сформироваться не смогли. Подавление гена *PTEN* увеличивало образование белка циклина D1, что вызывало пролиферацию клеток в железах. Также было показано, что рост желез находится в зависимости от сигнального пути PI3K/Akt, регулируемого белком PTEN, который инактивирует передачу сигнала (Eritja et al., 2010).

Аналогичную 3D-модель использовали при исследовании поглощения аминокислоты глутамина раковыми клетками эндометрия (Marshall et al., 2017). В раковых клетках эндометрия обнаружена высокая экспрессия фермента ASCT2, который связан с переносом глутамина внутрь клетки. При ингибировании этого фермента, происходит подавление роста опухолевых клеток, что говорит о возможности лечения рака эндометрия фармакологическими агентами, направленными на исключение проникновения этой аминокислоты в раковые клетки.

Существует острая необходимость в разработке и оптимизации экспериментальных моделей для изучения имплантации у человека. Целью таких исследований явилось создание 3D-культуральной системы, похожей на эндометрий человека, и изучение механизмов прикрепления сфероидных клеток трофобласта к клеткам культуры. Основным отличием от описываемых ранее 3D-моделей являлось использование в качестве матрикса плазмы человека. Иммуноферментный анализ показал, что прикрепленные к клеткам культуры сфероиды секретируют ХГЧ, при этом количество секрета было прямо пропорционально размеру клетки трофобласта (Wang et al., 2012). Помимо ХГЧ сфероиды Jar секретируют 17 β -эстрадиол (E₂) и прогестерон (P4), что говорит о их физиологической активности. С увеличением времени культивирования увеличивалось и количество секретируемых гормонов (Wang et al., 2013).

3D-культивирование может помочь прояснить механизмы главных этапов имплантации эмбриона: оппозиции, адгезии и инвазии в строму. Была предложена 3D-матрица на основе Матригеля, в которую помещали эмбрионы макак-резусов (*Macaca mulatta*) (Chang et al., 2018). В своем эксперименте эти авторы наблюдали хэтчинг эмбрионов, их рост, миграцию трофобластов во внеклеточную среду, секрецию прогестерона и хорионического гонадотропина и другую активность. Предложенная 3D-система позволяет добавлять к Матригелю различные компо-

ненты, иммунные клетки или факторы роста, что дает возможность оценивать влияние этих веществ.

3D-культуры эндометрия также могут использоваться для исследования и поиска новых фармакологических агентов. Так, было изучено влияние вещества наркотина (narcotine) на эктопический эндометрий у пациентов с эндометриозом и на нормальный эндометрий, полученный от здоровых фертильных женщин (Khazaeia et al., 2019). Этот препарат является природным растительным алкалоидом, выделенным из Мака снотворного (*Papaver somniferum*). Для создания 3D-структуры использовали фибриновый гель, состоящий из фибриногена и тромбина. Развитие роста клеток оценивали визуально. При действии высоких дозировок наркотина (100–200 мкМ) наблюдали почти полное подавление роста как эктопических, так и нормальных клеток эндометрия. Таким образом, наркотин проявил себя как препарат, который возможно использовать для лечения эндометриоза (Khazaeia et al., 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методы 3D-культивирования клеток эндометрия более детально позволяют представить процессы, протекающие *in vivo*, что значительно расширяет возможности поиска решений для различных прикладных клинических задач, в том числе направленных на оптимизацию лечения гинекологических заболеваний — опухолей эндометрия, эндометриоза, инфекционной патологии, а также на изучение механизмов имплантации эмбриона, которые являются ключевыми для успеха процедуры ЭКО.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-015-00449 А).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы не проводили эксперименты с участием людей или животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии 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. акад. журнал. Т. 12. № 1. С. 28. (Ailamazyan E.K., Petrosyan M.A., Tolibova G.H., Krylova T.A., Goryachaya T.S., Petrova L.I., Durnova A.O., Polyakova V.O., Kvetnoy I.M. 2012. Culture of human endometrium — model for studying reproductive function. Med. Acad. J. V. 12. P. 28.)

Домнина А.П., Фридлянская И.И., Земелько В.И., Пуговкина Н.А., Ковалева З.В., Зенин В.В., Гринчук Т.М., Никольский Н.Н. 2013. Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека при длительном культивировании не подвергаются спонтанной трансформации. Цитология. Т. 55. № 1. С. 69. (Domnina A.P., Fridlyanskaya I.I., Zemelko V.I., Pugovkina N.A., Kovaleva Z.V., Zenin V.V., Grinchuk T.M., Nikolsky N.N. 2013. Mesenchymal stem cells of human endometrium do not undergo spontaneous transformation during long-term cultivation. Tsitologiya. V. 55. P. 69.)

Дурнова А.О., Крылова Ю.С., Пантелеев Л.Н., Мусихин С.Ф. 2014. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия — применение в патоморфологических исследованиях. Биотехносфера. Т. 5. № 35. С. 30. (Durnova A.O., Krylova Ju.S., Panteleev L.N., Musihin S.F. 2014. Application of laser scanning confocal microscopy to pathomorphology analysis. Biotexnosfera. V. 5. P. 30.)

Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арыбашиева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. Т. 53. № 12. С. 919. (Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artzibasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Bichevaia N.K., Korsak V.S., Nikolsky N.N. 2012. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization and use as feeder layer for maintenance of human embryonic stem cell lines. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 6. P. 11.)

Мингалева Р.Н., Соловьева В.В., Блатт Н.Л., Ризванов А.А. 2013. Применение культур клеток и тканей для скрининга противоопухолевых препаратов *in vitro*. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. Т. 8. № 2. С. 20. (Mingaleeva R.N., Solovieva V.V., Blatt N.L., Rizvanov A.A. 2013. Application of cell and tissue cultures for potential anti-cancer/oncology drugs screening *in vitro*. Kletochhnaya Transplantologiya i Tkanevaya Inzheneriya. V. 8. P. 20.)

Мусина Р.А., Белявский А.В., Тарусова О.В., Соловьева Е.В., Сухих Г.Т. 2008. Мезенхимальные стволовые клетки эндометрия, полученные из менструальной крови. Клеточные технологии в биологии и медицине. № 2. С. 110. (Musina R.A., Tarusova O.V., Solovyova E.V., Sukhikh G.T., Belyavski A.V. 2008. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. Bull. Exp. Biol. Med. (Kletochnye Tehnologii V Biologii I Medicine). V. 145. P. 539.)

Петросян М.А., Мележникова Н.О., Домнина А.П., Андрюшина 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. Т. 59. № 10. С. 676. (Petrosyan M.A., Melezhnikova N.O., Domnina A.P., Andryushina V.A., Goryachaya T.S., Petrova L.I., Malysheva O.V., Razygraev A.V., Polyakova V.O., Sapronov N.S. 2018. Search of a new cellular model for investigation of pharmacological activity of progesterone analogues. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 12. P. 57.)

Петросян М.А., Мележникова Н.О., Домнина А.П., Малышева О.В., Швед Н.Ю., Петрова Л.И., Полянских Л.С., Базиян Е.В., Молотков А.С. 2019. Децидуальная диф-

- ференцировка эндометриальных клеточных линий в норме и при патологии. Цитология. Т. 61. № 11. С. 902. (Petrosyan M.A., Melezhnikova N.O., Domnina A.P., Malyshova O.V., Shved N.Yu., Petrova L.I., Polyanskikh L.S., Baziyani E.V., Molotkov A.S. 2019. Decidual differentiation of endometrial cell lines in normal and pathology. Cell Tiss. Biol. (Tsitolgiya). V. 14. P. 113.)
- Семина Е.В., Рубина К.А., Сысоева В.Ю., Степанова В.В., Ткачук В.А. 2016. Трехмерная модель биоматрикса как способ изучения роста кровеносных сосудов и нервов в тканеинженерных конструкциях. Вестник Московского Университета. Серия 2: Химия. Т. 57. № 3. С. 160. (Semina E.V., Rubina K.A., Sysoeva V.Yu., Stepanova V.V., Tkachuk V.A. 2016. 3D-model of biomatrix as a method of studying blood vessels and nerves growth in tissue engineering structures. Moscow University Chemistry Bulletin. (Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seriya 2: Himiya). V. 57. P. 160.)
- Bentin-Ley U., Pedersen B., Lindenberg S., Falck Larsen J., Hamberger L., Horn T. 1994. Isolation and culture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system. J. Reprod. Fertil. V. 101. P. 327.
- Brueggmann D., Templeman C., Starzinski-Powitz A., Rao N.P., Gayther S.A., Lawrenson K. 2014. Novel three-dimensional in vitro models of ovarian endometriosis. J. Ovarian Res. V. 7. P. 17.
- Chang T.A., Bondarenko G.I., Gerami-Naini B., Drenzek J.G., Durning M., Garthwaite M.A., Schmidt J.K., Golos T.G. 2018. Trophoblast differentiation, invasion and hormone secretion in a three-dimensional *in vitro* implantation model with rhesus monkey embryos. Reprod. Biol. Endocrinol. V. 16. P. 24.
- Edmondson R., Broglie J.J., Adcock A.F., Yang L. 2014. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. Assay Drug Dev. Technol. V. 12. P. 207.
- Eritja N., Llobet D., Domingo M., Santacana M., Yeramian A., Matias-Guiu X., Dolcet X. 2010. A novel three-dimensional culture system of polarized epithelial cells to study endometrial carcinogenesis. Am. J. Pathol. V. 176. P. 2722.
- Eritja N., Mirantes C., Llobet D., Masip G., Matias-Guiu X., Dolcet X. 2012. ER α -mediated repression of pro-inflammatory cytokine expression by glucocorticoids reveals a crucial role for TNF and IL1 in lumen formation and maintenance. J. Cell Sci. V. 125. P. 1929.
- Gellersen B., Brosens J.J. 2014. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. Endocr. Rev. V. 35. P. 851.
- 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. V. 52. P. 761.
- Kajihara T., Brosens J.J., Ishihara O. 2013. The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy. Med. Mol. Morphol. V. 46. P. 61.
- Khazaei M.R., Nasr-Esfahanib M.H., Chobsaza F., Khazaei M. 2019. Noscapine inhibiting the growth and angiogenesis of human eutopic endometrium of endometriosis patients through expression of apoptotic genes and nitric oxide reduction in three-dimensional culture model. Iran. J. Pharm. Res. V. 18 P. 836.
- Kibbey M.C. 1994. Maintenance of the EHS sarcoma and Matrigel preparation. J. Tissue Cult. Methods. V. 16. P. 227.
- Kim M.R., Park D.W., Lee J.H., Choi D.S., Hwang K.J., Ryu H.S., Min C.K. 2005. Progesterone-dependent release of transforming growth factor-beta1 from epithelial cells enhances the endometrial decidualization by turning on the Smad signalling in stromal cells. Mol. Hum. Reprod. V. 11. P. 801.
- Kuroda K., Venkatakrishnan R., Salker M.S., Lucas E.S., Shaheen F., Kuroda M., Blanks A., Christian M., Quenby S., Brosens J.J. 2013. Induction of 11 β -HSD 1 and activation of distinct mineralocorticoid receptor- and glucocorticoid receptor-dependent gene networks in decidualizing human endometrial stromal cells. Mol. Endocrinol. V. 27. P. 192.
- Łaniewski P., Gomez A., Hire G., So M., Herbst-Kralovetz M.M. 2017. Human three-dimensional endometrial epithelial cell model to study host interactions with vaginal bacteria and *Neisseria gonorrhoeae*. Infect. Immun. V. 85 : e01049.
- Li Q., Kannan A., DeMayo F.J., Lydon J.P., Cooke P.S., Yamagishi H., Srivastava D., Bagchi M.K., Bagchi I.C. 2011. The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2. Science. V. 331. P. 912.
- Marshall A.D., van Geldermalsen M., Otte N.J., Lum T., Vellozzi M., Thoeng A., Pang A., Nagarajah R., Zhang B., Wang Q., Anderson L., Rasko J.E.J., Holst J. 2017. ASCT2 regulates glutamine uptake and cell growth in endometrial carcinoma. Oncogenesis. V. 6 : e367.
<https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.70>
- Meng C.X., Andersson K.L., Bentin-Ley U., Gemzell-Danielsson K., Lalitkumar P.G. 2009. Effect of levonorgestrel and mifepristone on endometrial receptivity markers in a three-dimensional human endometrial cell culture model. Fertil. Steril. V. 91. P. 256.
- Okada H., Nie G., Salamonsen L.A. 2005. Requirement for proprotein convertase 5/6 during decidualization of human endometrial stromal cells *in vitro*. J. Clin. Endocrinol. Metab. V. 90. P. 1028.
- Okada H., Tsuzuki T., Murata H. 2018. Decidualization of the human endometrium. Reprod. Med. Biol. V. 17. P. 220.
- Pawar S., Hantak A.M., Bagchi I.C., Bagchi M.K. 2014. Mini-review: Steroid-regulated paracrine mechanisms controlling implantation. Mol. Endocrinol. V. 28. P. 1408.
- Schutte S.C., Taylor R.N. 2012. A tissue engineered human endometrial stroma that responds to cues for secretory differentiation, decidualization and menstruation. Fertil. Steril. V. 97. P. 997.
- Sengupta S., Sengupta J., Mittal S., Kumar S., Ghosh D. 2008. Effect of human chorionic gonadotropin (hCG) on expression of vascular endothelial growth factor a (VEGF-a) in human mid-secretory endometrial cells in three-dimensional primary culture. Indian J. Physiol. Pharmacol. V. 52. P. 19.
- Shindoh H., Okada H., Tsuzuki T., Nishigaki A., Kanzaki H. 2014. Requirement of heart and neural crest derivatives-expressed transcript 2 during decidualization of human endometrial stromal cells *in vitro*. Fertil. Steril. V. 101. P. 1781.
- 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. Rep. V. 4. P. 4599.

- Tang B., Gurpide E. 1993. Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stromal cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* V. 47. P. 115.
- Wang H., Bocca S., Anderson S., Yu L., Rhavi B.S., Horcajadas J., Oehninger S. 2013. Sex Steroids Regulate Epithelial–Stromal Cell Cross Talk and Trophoblast Attachment Invasion in a three-dimensional human endometrial culture system. *Tissue Eng. Part C.* V. 19. P. 676.
- Wang H., Pilla F., Anderson S., Martinez-Escribano S., Herrer I., Moreno-Moya J.M., Musti S., Bocca S., Oehninger S., Horcajadas J.A. 2012. A novel model of human implantation: 3D endometrium-like culture system to study attachment of human trophoblast (Jar) cell spheroids. *Mol. Hum. Reprod.* V. 18. P. 33.
- Yang H., Han S., Kim H., Choi Y.M., Hwang K.J., Kwo H.C., Kim S.K., Cho D.J. 2002. Expression of integrins, cyclooxygenases and matrix metalloproteinases in three-dimensional human endometrial cell culture system. *Exp. Mol. Med.* V. 34. P. 75.

3D Cultures of Endometrial Cells: Opportunities and Prospects

A. O. Drobintseva^{a, b}, A. S. Averkieva^c, M. A. Petrosyan^{d, e, *}, A. P. Domnina^f,
I. M. Kvetnoy^{b, g}, and V. O. Polyakova^{a, b}

^aSaint Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, 194100 Russia

^bSaint Petersburg Scientific Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, 191036 Russia

^cSaint Petersburg State Institute of Technology, St. Petersburg, 190013 Russia

^dOtt Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, 199034 Russia

^eAlmazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, 194156 Russia

^fInstitute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

^gSt. Petersburg University, St. Petersburg, 199034 Russia

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

The review presented the information about cultivating of cells isolated from endometrial tissue in 3D models. Various methods of 3D-cultivation of endometrial cells are described, their characteristics are presented, as well as application of 3D-cultures in the field of biomedical research. Possibilities of using 3D cultures to study pathogenesis and develop methods of therapy of diseases such as endometrial cancer and endometriosis are considered, research results related to endometrial decidualization and blastocyst implantation in 3D systems are analyzed.

Keywords: 3D cultivation, endometrium, decidualization, IVF, endometriosis, endometrial cancer