

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 618.14-005.1

КУЛЬТУРА ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА: МОДЕЛЬ ИЗУЧЕНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ*

¹Э. К. Айламазян, ¹М. А. Петросян, ¹Г. Х. Толибова, ²Т. А. Крылова, ²Т. С. Горячая, ¹Л. И. Петрова,
¹А. О. Дурнова, ¹В. О. Полякова, ¹И. М. Кветной

¹Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

CULTURE OF HUMAN ENDOMETRIUM — MODEL FOR STUDYING REPRODUCTIVE FUNCTION

¹E. K. Ailamazyan, ¹M. A. Petrosyan, ¹G. H. Tolibova, ²T. A. Krylova, ²T. S. Goryachaya, ¹L. I. Petrova,
¹A. O. Durnova, ¹V. O. Polyakova, ¹I. M. Kvetnoy

¹D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology RAMS, St.-Petersburg, Russia

²Institute of Cytology RAS, St.-Petersburg, Russia

© Коллектив авторов, 2012 г.

Настоящее исследование посвящено характеристике клеточной популяции, полученной из нормального эндометрия человека. Описаны условия выделения, культивирования, криоконсервации и фенотип культуры эндометриальных клеток. Показано наличие маркеров к рецепторам эстрогенов и прогестерона. Представлены результаты иммунофенотипирования и карiotипирования эндометриальной линии.

Ключевые слова: эндометрий человека, эстрогены, прогестерон, рецепторы, клеточная популяция эндометрия, мезенхимные клетки, иммунофенотип.

The present study is dedicated to the characterization of the cell population obtained from the normal human endometrium. The conditions of selection, cultivation, cryopreservation and the phenotype of the cultured endometrial cells are described. Receptors of estrogen and progesterone as immunohistochemical markers of the endometrium are revealed. Data of precise immunophenotyping and cariotyping of the isolated human endometrium cells are presented.

Key words: human endometrium, estrogen, progesterone, receptors, endometrial cell populations, mesenchymal stem cell, immunophenotype.

Введение. Эндометрий человека является динамической реконструирующей тканью, которая, реагируя на половые стероидные гормоны, претерпевает циклический рост, трансформацию, отторгаясь и регенерируя более 400 раз в течение активного репродуктивного периода женщины. Эти изменения носят циклический характер и строго подчиняются гормональным воздействиям. На способности эндометрия отвечать на гормональное воздействие различных аналогов прогестерона основан классический метод оценки гестагенной активности соединений —

тест Clauberg-McPhail, являющийся в настоящее время «золотым стандартом». Гестагенная активность традиционно изучалась на моделях животных и оценивалась по степени прегравидных изменений эндометрия эстрогенподготовленных инфантильных самок кроликов [1]. Однако использование животных в качестве моделей ограничивает возможность скринингового тестирования оригинальных соединений на первичном отборочном этапе исследований, делая их дорогостоящими, трудоемкими и длительными. Напротив, используя в качестве модели кле-

* Авторский коллектив благодарит сотрудников отделения гинекологической эндокринологии В. В. Рулева и М. А. Шалину за предоставленный для исследования биопат эндометрия; сотрудника ИИЦ РАН В. В. Зенина за помощь в определении клеточных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии, сотрудника лаборатории микробиологии К. В. Шалепо за исследование контаминации в предоставленных образцах, а также сотрудников лаборатории пренатальной диагностики врожденных и наследственных заболеваний человека А. В. Киселева, О. Г. Чиряеву, О. А. Ефимову за консультации по вопросам цитогенетики.

точные линии, мы имеем возможность быстрого получения результатов, прижизненного наблюдения за моделью в течение всего эксперимента; используемый материал отличается дешевизной и доступностью. Немаловажное преимущество — воспроизводимость результатов, полученных на клеточных линиях, сохраняющих видовую и органотканевую специфичность в течение всего эксперимента.

К настоящему времени накоплен большой научный опыт изучения и использования различных гестагенов, их рецепторного взаимодействия, влияния на дифференциацию и апоптоз клеток, экспрессии генов регуляторных и сигнальных молекул [2–9]. Влияние прогестина на органы и ткани до сих пор остается предметом обширных дебатов в научной литературе. Отчасти это объясняется противоречивостью данных, полученных в результате исследований *in vivo* и *in vitro*. Последнее пятилетие можно охарактеризовать экспоненциальным ростом числа публикаций о чисто клинических проблемах патологии эндометрия. Большинство работ имеет сугубо прикладной характер и решает наиболее актуальные проблемы частных областей медицины. Обширный ряд работ посвящен патологии и лечению эндометриоза [10–12]. Много внимания уделяется изучению злокачественного перерождения эндометрия [13–15]. В последнее время появился еще один интересный аспект проблемы: обсуждается использование эндометриальных клеток в качестве материала для регенеративной медицины [16].

Безусловно, полностью отказаться от экспериментов на моделях животных в ближайшее время не представляется возможным. Тем не менее наличие быстрого и эффективного способа тестирования соединений на наличие гестагенной активности значительно упрощает решение проблемы поиска новых эффективных лекарственных препаратов для терапии различных акушерско-гинекологических социально значимых заболеваний.

Данная статья является первым оригинальным сообщением о разработке новой клеточной модели на основе первичной культуры эндометрия человека.

Материалы и методы исследования. Ткань эндометрия человека. Эндометриальная ткань была получена из матки трех пациенток в результате проведения диагностической гистероскопии и аспирационной пайпель-биопсии. Взятие материала проводилось в стерильных условиях операционного блока на 13-й день менструального цикла. Сразу после взятия биоптат помещали в пробирку с транспортной средой.

Изолирование клеток из эндометрия человека. Фрагменты ткани эндометрия многократно промывали раствором PBS (без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+}) с до-

бавлением антибиотика гентамицина. Для получения клеточной суспензии ткань измельчали на мелкие фрагменты около 1 мм и затем подвергали ферментативной обработке 0,1% раствором коллагеназы I типа (Gibco). Время инкубации 20–30 мин при комнатной температуре с использованием качающегося столика. Действие фермента нейтрализовали добавлением эквивалентного объема питательной среды с сывороткой, после чего центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в ростовой среде DMEM/F₁₂ с 15% эмбриональной телячьей сыворотки. Далее клеточную суспензию эндометриальных клеток переносили в культуральную посуду. Посевная концентрация составляла 1 млн на см². В течение первых трех дней каждые 24 часа проводили смену среды.

Культивирование популяции эндометриальных клеток человека. Культивирование эндометриальных клеток человека проводили во всех случаях в идентичных условиях, в среде DMEM/F₁₂ с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицина (50 мкг/мл). Клетки культивировали в стандартных условиях при 37° С и 5% CO₂. Смену среды проводили каждые 2–3 дня. По достижении клетками 80% конфлюентного монослоя их рассеивали с концентрацией 150–200 клеток на см². Пересев проводили с помощью 0,25% раствора трипсина с ЭДТА. В процессе культивирования на ранних пассажах клетки замораживали в жидком азоте с 10% диметилсульфоксида (DMSO) в 50% эмбриональной сыворотки.

Криоконсервация первичной культуры эндометрия. Для исследования свойств эндометрия и дальнейшего использования необходимо иметь клеточную культуру на ранних пассажах после выделения из ткани. Общепринятая процедура криоконсервации позволяет обеспечить необходимым пулом клеток на ранних и поздних сроках культивирования. Средой заморозки служила ростовая среда с 10% DMSO. Для криоконсервации конфлюентную культуру клеток эндометрия промывали дважды раствором фосфатного буфера (DPBS). Монослой клеток диссоциировали 0,25% раствором трипсин-версен (SIGMA). Действие фермента инактивировали добавлением эквивалентного объема питательной среды. Затем определяли концентрацию клеток и центрифугировали при 1000 об/мин 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в среде для заморозки и разливали в криовials с концентрацией клеток не менее 1×10^6 . Криовials переносили в контейнер для замораживания на -80°C (Mr. Frosty, Nalgene). Через сутки клетки переносили в жидкий азот для длительного хранения. Процедуру оттаивания про-

водили в водяной бане на 37°C . Из азота клетки быстро переносили в водяную баню до полного оттаивания, центрифугировали и рассеивали в культуральные флаконы. Жизнеспособность размороженной культуры определяли с помощью красителя трипанового синего.

Постановка иммуногистохимической реакции.

Для определения иммуногистохимических маркеров культивируемые эндометриальные клетки были посеяны на чашки Петри или предметные стекла.

Клетки дважды промывали в фосфатно-солевом буфере (рН 7,5) по 5 мин в каждой порции. Затем фиксировали 96% этиловым спиртом, охлажденным до -20°C , в течение 5 мин. Блокада эндогенной пероксидазы проводилась следующим образом.

Чашки Петри с культурами заливали 2 мл 3% водного раствора перекиси водорода (H_2O_2) на 15 мин, а затем дважды промывали в фосфатно-солевом буфере (рН 7,5) по 5 мин.

Далее образцы инкубировали с первичными (специфичными) антителами. В качестве первичных антител были взяты Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor α Clone: 1D5 Izotip: IgG1, kappa (Dako, 1:35, инкубировали 30 мин при комнатной температуре 21°C) и Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor Clone: PgR636 Izotip: IgG1, kappa (Dako, 1:50, инкубировали 1 час при 37°C в термостате). Затем следовала промывка в двух сменах фосфатно-солевого буфера по 5 мин и инкубирование 30 мин с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой (EnVision Detection System, Peroxidase/DAB, Rabbit, Mouse). В качестве вторичных антител использовали универсальный набор, содержащий биотинилированные антимышьи иммуноглобулины (EnVision Detection System, Peroxidase/DAB, Mouse).

Для выявления пероксидазы хрена применяли диаминобензидин. Проявление реакции контролировали под микроскопом.

Проточная цитофлуориметрия. Фенотипический анализ эндометриальных клеток человека проводили с помощью проточных цитофлуориметров FACS Canto II (BD, США) и EpicS XL (Beckman Coulter, США). Окраску выполняли моноклональными антителами, мечеными различными флуорохромами: CD 31 (FITC), Cytokeratin (PE), CD45 (PerCP), CD34 (PE-Cy7), CD44 (APC), CD146 (PE), CD73 (PE), CD9 (FITC), CD13 (PE). Для анализа флуоресценции эндометриальных клеток человека проводили их гейтирование в координатах FSC — SSC (гейт P1, рис. 1). События, попавшие в регион P1, анализировали на предмет экспрессии CD31, CD34, CD44, CD45, Cytokeratin

(цитометр FACS Canto II; BD, США). Границы устанавливали на основании предшествующего измерения флуоресценции клеток, окрашенных изотипическими антителами. Анализировали относительное содержание эндометриальных клеток человека, экспрессирующих исследуемые поверхностные маркеры. Данные об экспрессии поверхностных клеточных маркеров CD9, CD13, CD73 и CD146 (цитометр Beckman Coulter, США) не представлены.

Кариотипирование клеточной линии. Цитогенетический анализ клеточной культуры эндометрия проводили с 6-го по 16-й пассажи. За два часа до фиксации клеток в культуры добавляли колхицин в конечной концентрации 8 мкг/мл для остановки клеточного цикла на стадии метафазы митоза. По окончании действия колхицина с помощью ферментативной обработки (трипсин-версен) клеточную суспензию делящихся клеток собирали в центрифужные пробирки и осаждали центрифугированием при

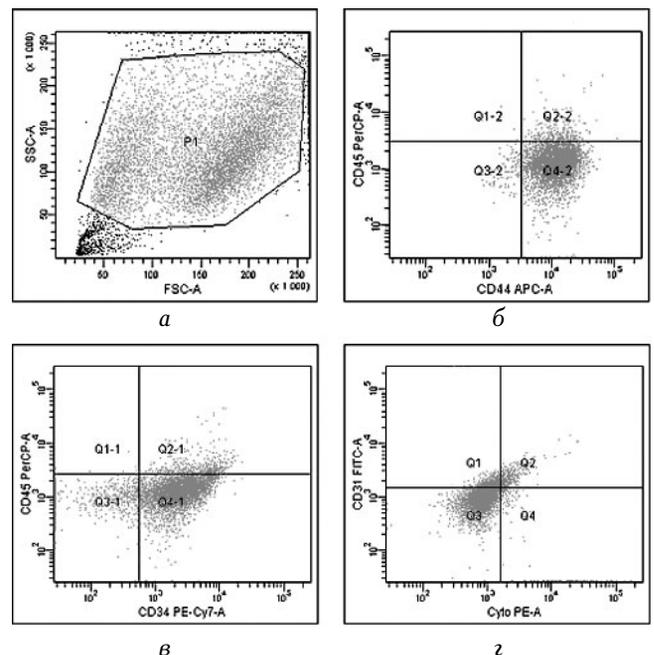


Рис. 1. Графики гейтирования и анализа эндометриальных клеток человека: а — двумерная гистограмма эндометриальных клеток человека в координатах FSC-SSC. Гейт P1 содержит эндометриальные клетки человека; б — двумерная гистограмма эндометриальных клеток человека в координатах CD44/CD45; в — двумерная гистограмма эндометриальных клеток человека в координатах CD34/CD45; г — двумерная гистограмма эндометриальных клеток человека в координатах Cytokeratin/CD31.

1500 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадок встряхивали и заливали гипотоническим раствором (0,55% KCl). Гипотоническую обработку проводили при 37°C в течение 20 мин. Действие гипотонии останавливали добавлением 100 мкл свежеприготовленного фиксатора (смесь

95% этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1). Клетки осаждали центрифугированием 1500 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадок встряхивали и добавляли 5 мл охлажденного фиксатора на 30 мин при -20°C . Смену фиксатора проводили 3 раза. Для приготовления препаратов хромосом после последнего центрифугирования над осадком оставляли 0,5–0,7 мл надосадочной жидкости. Полученную клеточную суспензию раскапывали на холодные мокрые предметные стекла и высушивали при комнатной температуре. Для кариотипирования использовали QFN метод дифференциального окрашивания [17].

Для анализа метафазных пластинок использовали микроскоп Leica DMLS, камера Leica DC 300 и специализированное программное обеспечение для анализа изображений.

Всего проанализировано на 12-м пассаже 10 метафазных пластинок, на 16-м пассаже — 18.

Результаты и их обсуждение. Для оценки первичной культуры эндометрия в качестве возможной модели для изучения фармакологической активности новых аналогов женских половых гормонов, прежде всего, необходимо дать характеристику эндометриальной клеточной линии, показать ее преимущества и недостатки по отношению к существующим моделям.

Взятие материала для выделения эндометриальных клеток человека — важный подготовительный этап. Фрагменты ткани эндометрия были получены путем гистероскопии и аспирационной биопсии. В первых двух случаях это были здоровые женщины репродуктивного возраста, имеющие в анамнезе год бесплодия и направленные в отделение гинекологической эндокринологии (руководитель проф. М. А. Тарасова) для проведения диагностической гистероскопии. При обследовании в анализах пациенток инфекций репродуктивного тракта не выявлено. Обе пациентки имели регулярный менструальный цикл. Операция проведена под общим наркозом на 13-й день менструального цикла. Фрагменты эндометриальной ткани взяты в стерильных условиях.

В то же время представляла интерес оценка информативности материала, полученного с помощью аспирационной биопсии эндометрия. В настоящее время в гинекологической практике аспирационная биопсия является достаточно распространенной диагностической манипуляцией. Показаниями к ее выполнению являются: диагностика гиперпластических процессов и рака эндометрия, контроль состояния эндометрия при проведении гормональной терапии, получение эндометрия для бактериологического исследования. По точности диагностики патологических изменений эндометрия аспирационная биопсия не уступает диаг-

ностическому выскабливанию и при этом имеет ряд существенных преимуществ: может осуществляться в амбулаторных условиях и является малоболезненной процедурой; выполняется менее чем за минуту; сопровождается минимальной травматизацией, так как не требует расширения цервикального канала; позволяет получить ткань из любых отделов полости матки; значительно снижает риск воспалительных осложнений. Аспирационная биопсия эндометрия была проведена с помощью инструмента Пайпеля, представляющего собой гибкий пластиковый цилиндр, который вводили в полость матки до контакта со слизистой оболочкой. Поршень, создавая отрицательное давление внутри цилиндра, втягивал в него ткань эндометрия. Подобная манипуляция проводилась с диагностической целью, так же как и в предыдущих случаях, в позднюю пролиферативную фазу менструального цикла.

Биоптаты, полученные в результате гистероскопии и аспирационной биопсии, помещали в отдельные пробирки с транспортной средой для дальнейшего выделения первичной эндометриальной клеточной популяции. Во всех трех случаях выделение клеток из эндометрия и их дальнейшее культивирование проводили в одинаковых условиях, согласно описанной выше методике.

Одной из основных проблем работы с культурами, в особенности первичными, является заражение клеточных линий различными группами микроорганизмов. Причинами такой контаминации клеток в культуре являются во многом очень богатые по составу питательные среды и реагенты, необходимые для культивирования. Сыворотка крови, трипсин, вода, как и руки оператора, могут служить источником инфицирования культуры. Микроорганизмы, контаминирующие клеточные линии, условно можно подразделить на два типа. Первый — это дрожжеподобные грибы и некоторые виды бактерий, второй тип — вирусы и микоплазмы. Именно микоплазменная инфекция культур клеток является наиболее частой и может приводить к неправильным результатам при работе с ними и даже полной потере линии. Микоплазмы могут изменять свойства клеток, в том числе и те, ради которых линия используется. Присутствие микоплазмы влияет на генетический и рецепторный аппарат клетки-хозяина [18, 19].

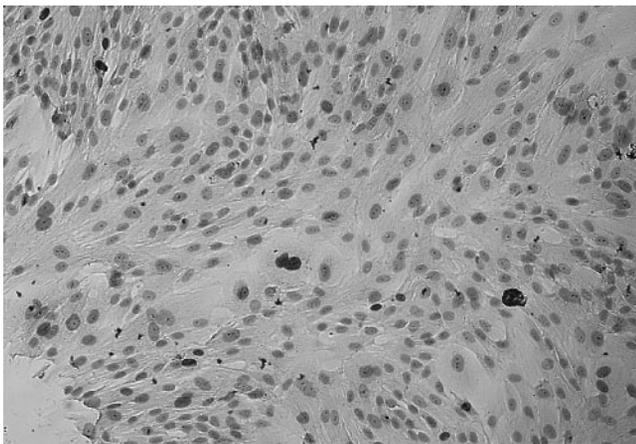
В наших исследованиях для предупреждения бактериальной контаминации культивирование эндометриальных клеток проводилось на средах с добавлением гентамицина. Кроме того, на 7-м и 16-м пассажах мы осуществляли контроль контаминации. Как показали микробиологические и молекулярно-биологические исследования (ПЦР, ПЦР в реаль-

ном времени), проведенные в лаборатории микробиологии (руководитель проф. А. М. Савичева), предоставленные для анализа образцы культуры эндометрия не были контаминированы какими-либо микроорганизмами.

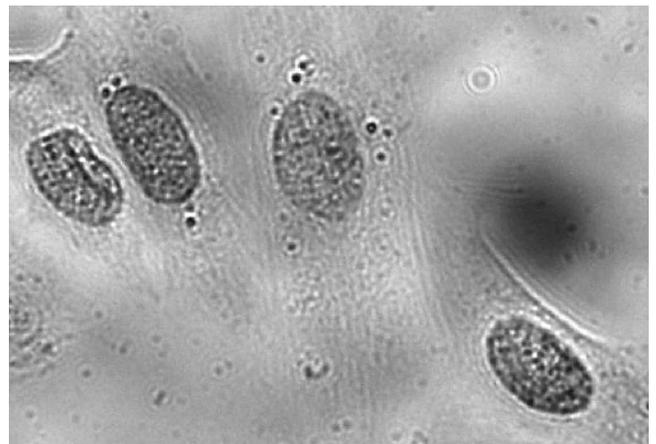
Морфологически культивируемые нами линии представляли собой гетерогенную популяцию фибробластоподобных клеток (рис. 2, а). Аналогичная морфология эндометриальных клеток человека при культивировании описана и другими авторами [20, 21]. Вытянутые тела клеток и их отростки были

шое внимание. Так, во всех культивируемых образцах эндометрия преобладала фибробластоподобная морфология клеток, что давало нам основание предполагать отсутствие контаминации эндометриальной линии со стороны других клеточных популяций.

Наличие делящихся клеток, образующих характерные для завершающей стадии митоза «восьмерки», являлось важным фактором определения пролиферативной активности, которая также была подтверждена маркером клеточной пролиферации ki67 (рис. 2, б).



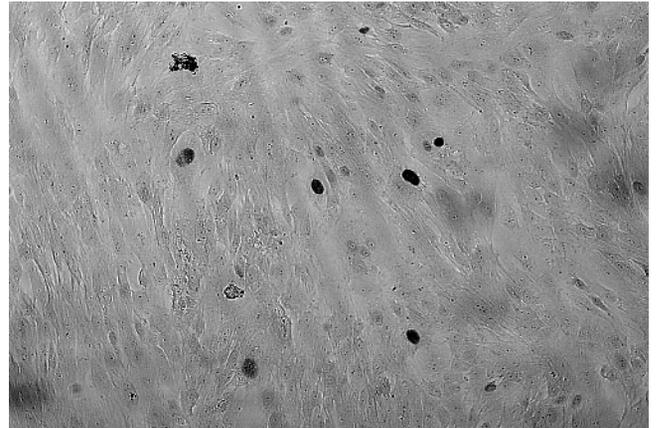
а



б



в



z

Рис. 2. Морфология культуры клеток эндометрия человека и экспрессия иммунофенотипических маркеров на 7-м пассаже: а — окраска гематоксилином, ув.100; б–z — иммуногистохимические маркеры: экспрессия маркера клеточной пролиферации ki67, ув. 400 (б); маркера к рецепторам эстрогенов, ув. 100 (в) и маркера к рецепторам прогестерона, ув. 200 (z).

плотно прижаты друг к другу, местами образуя завитки. Подобный фенотип значительно отличается от фенотипа эндотелиальной клеточной линии, представляющей собой «булыжную мостовую». Принимая во внимание обширную капиллярно-сосудистую сеть эндометрия, при выделении эндометриальной клеточной популяции возможность ее контаминации клетками эндотелия не может быть исключена. В связи с этим фенотипической характеристике культивируемых клеточных линий уделялось боль-

ше внимание. Все культуры эндометриальных клеток пересеивали с помощью трипсин-версена и выращивали до конфлюэнтного монослоя. Скорость пролиферации во всех образцах была сопоставимой, с момента пересева до образования конфлюэнта проходило в среднем 4 дня. Выживаемость после криоконсервации составила 80–85% по трипановому синему.

Следующим важным этапом наших исследований стала оценка клеточной популяции эндометрия человека на наличие рецепторов к женским половым

гормонам (эстрогенам и прогестерону). При рассмотрении возможности создания на основе эндометриальной клеточной линии модели для изучения эстрогенной и гестагенной активности новых, а также имеющихся препаратов обязательным условием является наличие в культивируемой клеточной линии необходимого рецепторного аппарата. Проведенные иммуногистохимические исследования показали наличие в культивируемых нами клетках эндометрия маркеров к рецепторам как эстрогенов, так и прогестерона (рис. 2, в, г).

Оценку рецепторного аппарата, иммунофенотипирование и кариотипирование культуры эндометриальных клеток проводили несколько раз, с 6-го по 16-й пассажи.

Анализ имеющихся немногочисленных публикаций по определению экспрессии поверхностных молекул клетками нормального человеческого эндометрия позволил выделить наиболее значимые, на наш взгляд, маркеры для иммунофенотипирования популяции эндометриальных клеток человека [20–22].

Как известно, эндометрий человека структурно и функционально разделен на два основных слоя. Верхние две трети представляет функциональный слой, содержащий железы, простирающиеся от поверхности эпителия к эндометриально-миометриальному основанию. Он состоит из псевдослоистого столбчатого эпителия окруженного васкуляризированной стромой. Во время менструации происходит отторжение именно этого слоя эндометрия. Нижнюю треть занимает базальный слой, содержащий базальную область желез, плотную строму и крупные сосуды. Этот слой сохраняется во время менструации и служит в качестве зародышевых компартов для создания нового функционального слоя. Каждый месяц 4–10 мм слизистой ткани растет в течение 4–10 дней в пролиферативной фазе менструального цикла под влиянием растущих циркулирующих уровней эстрогенов. Подобная регенерация эндометрия также происходит после родов и в постменопаузальный период у женщин, проходящих эстроген-заместительную терапию. У неменструирующих видов, например грызунов, эндометрий проходит циклы роста и апоптоза во время эстрального цикла [22]. Этот уровень нового тканевого роста похож на клеточный оборот в высокорегенеративной гемопоэтической ткани костного мозга, эпидермисе и кишечном эпителии. За клеточное производство в этих постоянно регенерирующих тканях отвечают взрослые стволовые клетки.

Неоднократно высказывалось предположение, что эндометрий человека также может содержать популяции соматических стволовых клеток, которые

ответственны за высокие регенеративные свойства этой ткани. В настоящее время существование в ткани нормального эндометрия человека клеток-предшественников (progenitor cells), обладающих высоким пролиферативным потенциалом, клоногенными свойствами, а также способностью дифференцироваться в различные типы тканей, подтверждено многими исследованиями [14, 20, 21, 23].

Недавно из эндометрия человека была выделена популяция клеток, которую рассматривают как стволовые клетки, отвечающие за функциональную активность этой ткани. Эта популяция связана с наличием поверхностных маркеров CD9 и CD13. CD9 является гликопротеином и экспрессируется на клеточной поверхности железистого эпителия на протяжении всего менструального цикла. CD13 экспрессируется в эндометриальной строме, также в течение всего менструального цикла, причем существенно выше в секреторную фазу [21].

Согласно результатам наших исследований, культивируемая эндометриальная клеточная линия в проточной цитофлуометрии показала высокий процент присутствия обеих поверхностных молекул. Экспрессия CD9 составила 87,9%, а экспрессия CD13 — 99,9% (таблица).

Таблица
Имунофенотип популяции эндометриальных клеток человека на 7-м пассаже

Тип маркера	Поверхностные молекулы	Относительное количество клеток, экспрессирующих маркер, %
Эндометриальные	CD9	87,9±0,5
	CD13	99,9±0,2
Мезенхимные	CD31	13,6±0,2
	CD44	92,7±0,3
	CD73	96,9±0,4
	CD146	50,0±0,3
Гемопоэтические	CD34	82,3±0,4
	CD45	0,1±0,1
Эпителиальные	Cytokeratin	0,1±0,1

Кроме того, мы проанализировали выделенную популяцию эндометриальных клеток на экспрессию таких маркеров, как CD31, CD44, CD73 и CD146. Иммунофенотипирование клеточной популяции методом проточной цитофлуометрии показало присутствие специфических маркеров в исследуемой нами клеточной культуре, что указывает на мезенхимное происхождение культивируемой линии (см. таблицу).

Полученные нами данные по экспрессии поверхностных молекул CD45 и Cytokeratin указывают на

отсутствие контаминации культивируемых эндометриальных клеток эпителиальными клетками и лейкоцитами.

В то же время выявленный иммунофенотип не исключает наличия в исследуемой культуре эндотелиальных клеток, также демонстрирующих позитивную реакцию на ряд специфических маркеров (CD13, CD31, CD44, CD146), что определяет целесообразность оценки в дальнейших исследованиях маркера эндотелиоцитов — фактора фон Виллебранда.

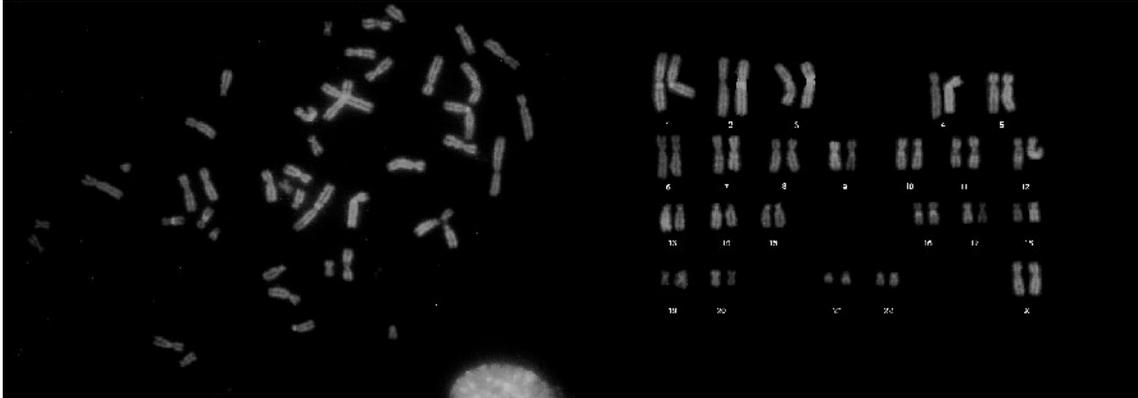


Рис. 3. Метафазная пластинка, полученная из клетки эндометрия при культивировании. 16-й пассаж (кариотип 46, XX). Окраска QFH/ACD.

С учетом мезенхимности происхождения культуры, а также длительности ее ведения (более 3 месяцев) предметом наших дальнейших исследований явилась оценка стабильности хромосомного набора эндометриальных клеток.

Согласно данным ряда исследований, при увеличении объема клеточной массы методом пассирования в культуре появляются клетки с возникшими *de novo* нарушениями хромосомного набора, дающие впоследствии аномальные клеточные линии [15, 24, 26, 27]. Изменение количества генетического материала может привести к аномальному функционированию генома, что оказывает крайне негативное влияние на клетку, вплоть до опухолевой трансформации. Возможными причинами возникновения аномалий хромосомного набора мезенхимных клеток могут быть собственно биологические свойства стволовых клеток, особенности условий культивирования, а также индивидуальные свойства генома клеток пациента, предрасполагающие к появлению хромосомных aberrаций. Эти факты необходимо учитывать, особенно при длительном культивировании. Именно поэтому цитогенетический анализ культур представлял интерес для характеристики клеточной популяции эндометрия человека.

Кариотипирование культуры эндометриальных клеток проводили на 6-м, 12-м и 16-м пассажах в лаборатории пренатальной диагностики врожденных и наследственных заболеваний человека (руководи-

тель проф. В. С. Баранов). В рамках выполненного цитогенетического анализа во всех проанализированных случаях был установлен нормальный конституционный кариотип, имеющий диплоидный набор хромосом (46, XX), что позволяет предположить отсутствие в исследуемых культурах эндометриальных клеток с хромосомными aberrациями (рис. 3). Однако чтобы уверенно это утверждать, а также предсказывать возможность появления аномалий кариотипа при более длительном пассировании куль-

тур, требуется увеличение числа проанализированных пассажей и метафазных пластинок.

Выводы

1. Для получения эндометриальной клеточной линии способ взятия биоптата путем проведения диагностической гистероскопии или аспирационной биопсии не имеет принципиального значения и может быть выбран, руководствуясь удобством и приемлемостью для каждой отдельной ситуации.

2. Популяция эндометриальных клеток человека гетерогенна и имеет фибробластоподобную морфологию.

3. Выделенная и культивируемая эндометриальная клеточная популяция имеет высокие показатели пролиферации и жизнеспособности после криоконсервации (80–85%).

4. В культивируемой клеточной линии эндометрия иммуногистохимически верифицирована экспрессия к рецепторам эстрогенов и прогестерона.

5. Фенотип клеточной популяции эндометрия человека определен как CD9⁺, CD13⁺, CD31⁺, CD34⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD146⁺, Cytokeratin⁻ и CD45⁻.

6. Показана принципиальная возможность получения препаратов хромосом из культивируемых клеток эндометрия с их последующим анализом, позволяющим оценить количество и структуру хромосом. Цитогенетический анализ не выявил аномалий кариотипа в метафазных пластинках клеток культивируемой эндометриальной линии.

7. Данная характеристика клеточной популяции эндометрия человека позволяет продолжить разработку новой клеточной модели, которая может быть использована как для фармакологических целей, так и для фундаментальных исследований молекулярно-клеточных механизмов имплантации.

Литература

1. Петросян М. А. Сравнительное изучение гестагенной активности синтетических аналогов прогестерона в эксперименте // Ученые записки.— 2007.— Т. 14, № 3.— С. 45–48.
2. Корхов В. В., Тапильская Н. И. Гестагены в акушерско-гинекологической практике: Руководство для врачей.— СПб.: СпецЛит, 2005.
3. Пальцев М. А., Кветной И. М. Руководство по нейроиммуноэндокринологии.— М.: Медицина, 2006.
4. Сергеев П. В., Шимановский Н. Л., Петров В. И. Рецепторы физиологически активных веществ.— М.; Волгоград, 1999.
5. Тарасова М. А. Использование половых стероидных гормонов и их аналогов с контрацептивной и лечебными целями // Журн. акуш. и жен. болезней.— 2010.— № 1.— С. 36–44.
6. Conneely O. M., Lydon J. P. Progesterone receptors in reproduction functional impact of the A and B isoforms // Steroids.— 2000.— Vol. 65.— P. 571–517.
7. Eden J. Progestins and breast cancer // Am. J. Obstet. Gynecol.— 2003.— Vol. 188, № 5.— P. 1123–1131.
8. Karafidou M., Kararos G., Rizos D. et al. Estrogen plus progestin treatment: effect of different progestin components on serum markers of apoptosis in healthy postmenopausal women // Fertil. Steril.— 2010.— Vol. 94, № 6.— P. 2399–2401.
9. Sutter-Dub M. Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types // Steroids.— 2002.— Vol. 67.— P. 77–93.
10. Giudice L. C., Kao L. C. Endometriosis // Lancet.— 2004.— Vol. 364.— P. 1789–1799.
11. Maia H., Maltez A., Studart E. et al. Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in endometrial polyps and in the normal endometrium during the menstrual cycle // BJOG.— 2004.— Vol. 111, № 11.— P. 1242–1247.
12. Omwandho C., Konrad L., Halis G. et al. Role of TGF-betas in normal human endometrium and endometriosis // Hum. Reprod.— 2010.— Vol. 25, № 1.— P. 101–109.
13. Mills A. M., Teri A. Endometrial hyperplasia // Longacre Semin Diagn Pathol.— 2010.— Vol. 27, № 4.— P. 199–214.
14. Gargett C. E., Masuda H. Adult stem cells in the endometrium // Mol. Hum. Reprod.— 2010.— Vol. 16, № 11.— P. 818–834.
15. Wang Y., Huso D. L., Harrington J. et al. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture // Cytotherapy.— 2005.— Vol. 7, № 6.— P. 509–519.
16. Maruyama T., Masuda H., Ono M. et al. Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology // Reproduction.— 2010.— Vol. 140.— P. 11–22.
17. Кузнецова Т. В., Логинова Ю. А., Чиряева О. Г. и др. Цитогенетические методы // Медицинские лабораторные технологии / Под ред. А.И. Карпищенко.— СПб.: Интермедика, 1999.— С. 550–578.
18. Борхсениус С. Н., Чернова О. А., Чернов В. М., Вонский М. С. Микоплазмы: молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика.— СПб.: Наука, 2002.
19. Ефремова Т. Н. Контаминация клеточных линий микоплазмами // Методы культивирования клеток / Под ред. Г. П. Пинаева, М. С. Богдановой.— СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2008.— С. 228–236.
20. Cervello I., Gil-Sanchis C., Mas A. et al. Human Endometrial Side Population Cells Exhibit Genotypic, Phenotypic and Features of Somatic Stem Cells // Human Endometrial Stem Cells.— 2010.— Vol. 5, № 6.
21. Kato K., Yoshimoto M., Kato K. et al. Characterization of side-population cells in human normal endometrium // Hum. Reprod.— 2007.— Vol. 22, № 5.— P. 1214–1223.
22. Gargett C. E., Chan R. W., Schwab K. E. Endometrial stem cell // Curr. Opin. Obstet. Gynecol.— 2007.— Vol. 19.— P. 377–383.
23. Dimitrov R., Timeva T., Kyurkchiev D. et al. Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium // Reproduction.— 2008.— № 135.— P. 551–558.
24. Шальгина Ю. А., Ефимова О. А., Кругляков П. В. и др. Сравнительный цитогенетический анализ мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток ранних пассажей и лимфоцитов человека // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.— 2009.— Т. 4, № 2.— С. 63–69.
25. Bockhov N. P., Voronina E. S., Kosyakova N. V. et al. Chromosome variability of human multipotent mesenchymal stromal cells // Bull. Exp. Biol. Med.— 2007.— Vol. 143, № 1.— P. 122–126.
26. Grigorian A. S., Kruglyakov P. V., Taminkina U. A. et al. Alterations of Cytological and Karyological Profile of Human Mesenchymal Stem Cells during in Vitro Culturing // Cell Technologies in Biology and Medicine.— 2010.— Vol. 3.— P. 125–130.
27. Tolar J. et al. Sarcoma Derived from Cultured Mesenchymal Stem Cells.— 2007.— Vol. 25.— P. 371–379.

Поступила в редакцию: 11.01.2012 г.

Контакт: Петросян Мария Анатольевна. mariya@labpharm.spb.ru