

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА РАЗВИТИЕ ДЕЦИДУАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКИ У КРЫС

© А. П. Домнина,^{1,*} В. М. Михайлов, Н. Н. Никольский^{1,2}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и

² С.-Петербургский государственный политехнический университет;

* электронный адрес: aldomnina@mail.ru

Одна из часто встречающихся причин невынашивания беременности — несостоятельность децидуальной реакции клеток эндометрия. Согласно одной из гипотез, подтвержденной экспериментальными данными, предшественниками децидуальных клеток у крыс и человека является костный мозг. Нами изучено влияние локальной трансплантации клеток костного мозга (ККМ) в стенку матки псевдобеременных крыс на рост и дифференцировку «ложных» дециду. В качестве ККМ использовали мононуклеарную фракцию ККМ, выделенную из длинных костей конечностей крыс. На 5-й день псевдобеременности в эндометрий правого рога матки трансплантировали суспензию ККМ крысы. Контрольным рогом служил левый рог матки, в который таким же образом вводили фосфатно-солевой буферный раствор. Результаты оценивали на 11-й день. Образовавшиеся дециду в правом роге характеризовались увеличением диаметра в мезо-антимезометральном направлении примерно в 1.5—2 раза по сравнению с контрольным рогом. Кроме того, общая масса правого рога увеличивалась приблизительно в 5 раз по сравнению с контрольным. ККМ, меченные Hoechst 33342 и РКН 26, были обнаружены в ткани дециду. Трансплантация мононуклеарных ККМ в матку псевдобеременных крыс не нарушала дифференцировку децидуальных клеток и организацию децидуальной ткани, сохраняя в образовавшейся дециду взаимное расположение дифференцированных децидуальных клеток. Таким образом, трансплантация ККМ в условиях ложной беременности стимулирует развитие децидуальной оболочки.

Ключевые слова: децидуальная ткань, децидуальные клетки, стволовые клетки костного мозга, псевдобеременность.

Принятые сокращения: ККМ — клетки костного мозга, БДК — большие децидуальные клетки.

Плацентарная недостаточность (нарушения формирования и созревания плаценты) является одной из причин дородовой гибели плода (50 % случаев мертворожденности) (Должиков, 2007). Формирование плаценты начинается после имплантации эмбриона в эндометрий. При этом клетки эндометрия претерпевают изменения, в результате которых образуются децидуальные клетки. У человека наиболее интенсивно образование децидуальных клеток происходит в месте имплантации. Спустя 9—10 сут после имплантации они отчетливо видны и в остальных отделах эндометрия.

Децидуальная трансформация более выражена в непосредственной близости к клеткам трофобласта. Полная децидуализация эндометрия завершается к концу 2-го мес беременности. Образование децидуальных клеток сопровождается выходом клеток эндометрия из пролиферативной активности. Низкодифференцированные клетки эндометрия сохраняют высокую пролиферативную активность. Высокая митотическая активность образовавшихся децидуальных клеток наблюдается в течение 1-го мес беременности.

Децидуальные клетки у человека развиваются в эндометрии из клеток-предшественников, локализующихся под эпителием матки (Михайлов, 1998). В результате

дифференцировки и пролиферации клеток-предшественников образуется несколько типов клеток, которые и формируют децидуальную ткань. Децидуальная ткань характеризуется высокой синтетической и метаболической активностью. В ней определяется высокая активность таких ферментов, как кислая глицерофосфатаза, сукцинатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа и неспецифические эстеразы. Расположение децидуальной ткани между клетками трофобласта и матки делает ее пограничной тканью. Вследствие этого предъявляются высокие требования к ее метаболизму и обновлению. Для выполнения пограничной функции децидуальные клетки человека синтезируют пролактин и другие биологически активные вещества (Михайлов, 1998). К-клетки в составе децидуальной ткани выполняют роль иммуносупрессоров, предотвращая отторжение плода, и сдерживают инвазивные свойства трофобласта за счет киллерной активности (Mikhailov, 2003).

Правильность прохождения всех процессов развития плаценты, особенно на стадиях образования децидуальной ткани, важна для имплантации эмбриона и успешного завершения беременности. При некоторых заболеваниях, когда нарушаются трофика и нормальное функционирование клеток эндометрия, правильное развитие

плаценты становится невозможным. Это приводит к выкидышам и бесплодию (Panayiotides et al., 2009).

Изучать ранние стадии образования децидуальной ткани трудно, особенно у человека. Еще труднее изучать предшественники децидуальных клеток. В настоящее время показано, что предшественниками децидуальных клеток являются стволовые клетки эндометрия (Gargett et al., 2007). Поддержание популяции предшественников стволовых клеток эндометрия, вероятно, происходит за счет миграции клеток костного мозга (ККМ) (Taylor et al., 2004).

Цель настоящей работы — проверить существующие данные об участии стволовых ККМ в поддержании функционального состояния децидуальной ткани (Du H et al., 2007; Morelli et al., 2013). Для этого мы выбрали экспериментальную модель псевдобеременности у крыс.

Материал и методика

Выделение ККМ. В качестве стволовых ККМ использовали моноклеарную фракцию ККМ (МККМ), выделенную из длинных костей конечностей крыс при помощи промывания костей забуференным физиологическим раствором, не содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} . Для получения моноклеарной фракции клеточную суспензию фракционировали в 63%-ном растворе Перколла, центрифугируя при 1500 *g* в течение 15 мин. Фракцию собирали и отмывали от Перколла в фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко, не содержащем Ca^{2+} и Mg^{2+} . Клетки считали в камере Горяева.

В отдельных экспериментах по трансплантации ККМ проводили мониторинг клеток после введения их лабораторным животным. Для этого ККМ метили прижизненными красителями Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, США) и РКН 26 (Sigma-Aldrich, США), которые флуоресцируют на разных длинах волн, что дает возможность наиболее точно определить местонахождение клеток. Краситель Hoechst 33342 в конечной концентрации 1 мкг/мл добавляли к клеткам в суспензии и окрашивали в течение 10 мин в CO_2 -инкубаторе при 37 °С. Далее остатки красителя удаляли с помощью центрифугирования и отмывали раствором PBS для полного удаления остатков красителя. Далее эти же клетки окрашивали мембранным красителем РКН 26 в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Чтобы проконтролировать качество окрашивания, часть суспензии помещали в чашки Петри с ростовой средой и культивировали. Результат анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

Подготовка животных и проведение операции. Были использованы 30 половозрелых самок белых беспородных крыс массой 200—220 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария с постоянным доступом к воде и корму. Отбор животных в стадии эструс выполняли методом микроскопии влагалищных мазков. Индукцию псевдобеременности осуществляли в фазе эструс раздражением влагалища крыс фарадическим электрическим током. Этот день обозначали как 1-й день псевдобеременности. На 5-й день псевдобеременности под эфирным наркозом проводили операцию. Животных фиксировали в дорсальном положении. Поле операции тщательно выбривали и дезинфицировали. Разрезы кожи и мышц брюшной стенки длиной 2 см производили, отступив от позвоночника на 1.5 см. Через разрезы извлекали правый и левый рога матки. В стенку правого рога

матки животных трансплантировали суспензию ККМ крысы (20 млн клеток в 20 мкл). Контрольным рогом служил левый рог матки, в который таким же образом вводили фосфатно-солевой буферный раствор. После этого рану ушивали послойно и животным предоставляли покой. На 11-й день псевдобеременности животным гуманно умерщвляли передозировкой эфирного наркоза.

Подготовка гистологических срезов и морфометрический анализ. Срезы сформировавшихся дециду толщиной 15 мкм готовили на криостате так, чтобы плоскость среза была перпендикулярна или параллельна длинной оси рога матки. При этом дециду ориентировали так, чтобы срез проходил параллельно мезометрально-антимезометральной оси матки. Строгая ориентация плоскостей срезов дециду позволяет иметь репрезентативные срезы для изучения региональной дифференцировки клеток дециду. Срезы фиксировали в смеси этанола с метанолом при -20 °С в течение 2 мин и окрашивали гематоксилином и эозином. При микроскопическом изучении оценивали целостность дециду и отсутствие очагов воспаления или некроза, а также степень дифференцировки дециду в мезометральном-антимезометральном направлении.

Морфометрический анализ проводили путем микроскопирования срезов, используя объектив 10×. При помощи окулярной линейки измеряли длину мезометрального-антимезометрального направления по диаметру среза от мышечной до мышечной оболочки в единицах окулярной линейки. Цену деления линейки определяли при помощи объект-микрометра. На этой же линии измерения определяли длину антимезометральной части дециду, которая образована большими децидуальными клетками (БДК), и вычисляли долю длины этой части дециду.

Рога матки взвешивали для сравнения развития децидуальной ткани в эксперименте и контроле. Рога матки извлекали, удаляли яичник и широкую маточную связку и взвешивали. Затем взвешивали только децидуальную ткань. Для этого рога матки разрезали по ходу внутриматочного канала и извлекали децидуальную оболочку.

Результаты и обсуждение

Результаты настоящей работы показывают, что при введении в полость матки псевдобеременных крыс суспензии ККМ децидуальная ткань развивается интенсивнее по сравнению с контролем (введение буферного раствора). На 11-й день псевдобеременности при вскрытии у животных обнаруживали сильно развитую дециду в опытном (левом) роге матки и умеренное ее развитие в контрольном (правом) роге (рис. 1). На рис. 2 представлены результаты взвешивания опытных и контрольных рогов, которые показывают, что по соотношению масс развитие ткани в опытном роге превосходит контрольный более чем в 3 раза. Анализ гистологических срезов показал, что трансплантация ККМ в матку псевдобеременных крыс не нарушает дифференцировку децидуальных клеток и организацию децидуальной ткани. В образовавшейся «ложной» дециду сохраняется нормальное взаимное расположение участков дифференцированных клеток. На рис. 3 изображены антимезометральная часть дециду, состоящая из БДК (слева), и мезометральная часть дециду, образованная малыми децидуальными клетками и гранулярными клетками эндометрия (справа). Величина



Рис. 1. Матка крысы с участками децидуа на 11-й день псевдобеременности.

В левый рог трансплантировали ККМ, в правый вводили фосфатно-солевой буферный раствор.

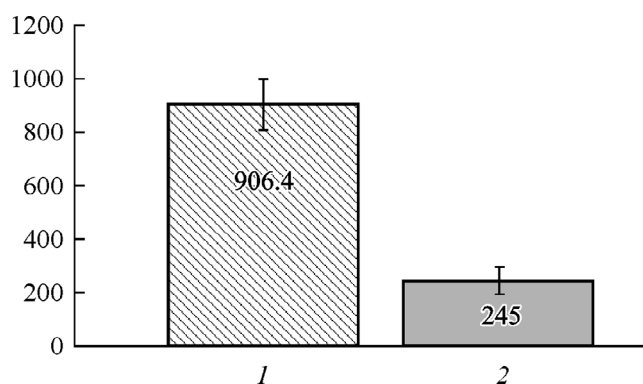


Рис. 2. Масса децидуальной ткани в правом (2) и контрольном (левом, 1) роге матки крысы после трансплантации ККМ.

Цифрами показана масса рога.

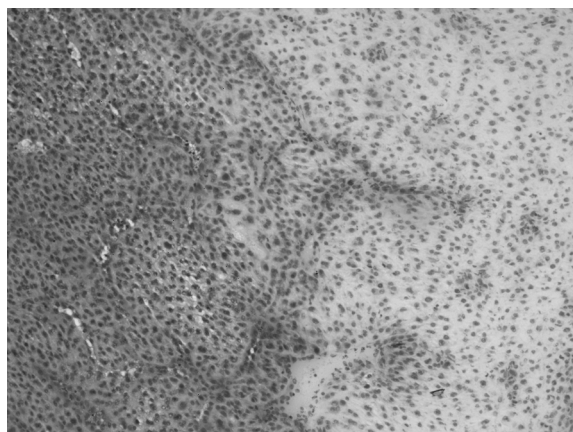


Рис. 3. Гистологический срез децидуальной оболочки.

Окраска гематоксилин-эозином. Об. 10×.

Результаты морфометрии срезов децидуальной оболочки матки крыс после трансплантации ККМ

Рог матки	Диаметр срезов, мм	Доля БДК (%) в общей толщине децидуа
Правый	4.6 ± 0.3	38.3 ± 7.3
Левый (контроль)	3.1 ± 0.8	45.1 ± 9.0

Примечание. 11 сут псевдобеременности.

зоны БДК по отношению к другим тканевым структурам в сравнении с контролем не изменялась. В местах локализации трансплантированных клеток отсутствовала лейкоцитарная инфильтрация, так как децидуальная ткань является иммунологически привилегированным местом, в котором блокировано развитие воспалительной реакции.

Для оценки влияния трансплантации стволовых клеток на дифференцировку БДК как наиболее дифференцированных клеток определяли толщину слоя БДК и вычисляли ее долю (%) в общем диаметре каждой децидуа. В таблице представлены данные морфометрии срезов децидуа, в которые трансплантировали ККМ крысы. Диаметр срезов опытного рога в мезо-антимезометральном направлении увеличился примерно в 1.5—2 раза по отношению к диаметру срезов децидуа контрольного рога.

Таким образом, трансплантация ККМ не изменяет структуру ткани, а увеличение размера децидуа происходит за счет более интенсивного развития всех тканевых элементов. ККМ усиливают пролиферацию собственных прогениторных клеток эндометрия крысы. Трансплантированные ККМ крысы были обнаружены в составе децидуальной ткани антимезометральной части децидуальной оболочки (рис. 4). На рисунке видны характерное синее свечение ядер, окрашенных красителем Hoechst 33342, и красное свечение мембраны клеток, окрашенной РКН 26. Максимальное количество меченых клеток наблюдали в районе соединения антимезометральной и мезометральной частей децидуа.

Ранее нами изучено влияние трансплантации стволовых клеток эндометрия человека (эМСК) на развитие децидуальной оболочки на аналогичной модели (Domnina et al., 2013). Эти клетки тоже стимулировали пролиферацию клеток децидуа у крыс. Это подтверждает данные

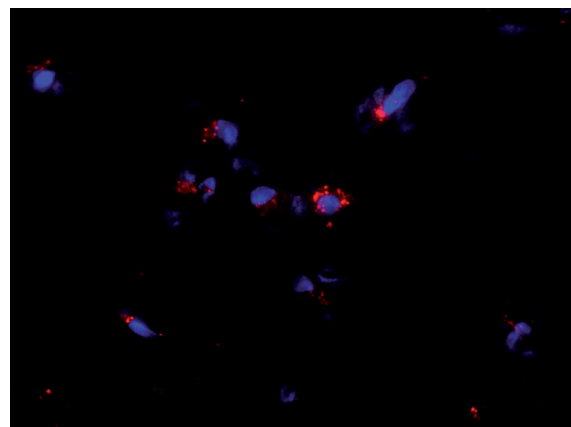


Рис. 4. ККМ на гистологическом срезе децидуальной оболочки крысы на 6-е сут после трансплантации.

Окраска ядер красителем Hoechst 33342 (синий цвет) и мембран клеток красителем РКН 26 (красный цвет). Об. 40×.

литературы о паракринном влиянии трансплантированных стволовых клеток на рост децидуальной ткани (Carlan et al., 2009; Prockop et al., 2009).

Было показано, что при внутривенном введении ККМ могут обнаруживаться в эндометрии человека и животных (Taylor et al., 2004; Cervello et al., 2012; Morelli et al., 2013). Исследователи делают вывод о том, что костный мозг может быть экзогенным источником стволовых клеток для эндометрия (Gargett et al., 2007). Эта точка зрения поддерживается результатами экспериментов, в которых мезенхимные стволовые ККМ *in vitro* под влиянием 8-Br-cAMP синтезировали маркеры децидуальных клеток, пролактина и IGFBP-1 (Aghajanova et al., 2010). Существуют клинические данные о положительном влиянии трансплантации ККМ в полость матки при синдроме Ашермана в случае недостаточной пролиферации эндометрия (Nagori et al., 2011). Авторы этой работы описывают клинический случай бесплодия, возникшего в результате синдрома Ашермана, при котором пациентке внутриматочно вводили CD9-, CD44- и CD90-позитивные аутологичные ККМ, что в последующем привело к увеличению толщины эндометрия и успешному развитию беременности.

Данные литературы свидетельствуют о том, что основной механизм действия трансплантированных ККМ состоит в секреции биологически активных молекул, что приводит к усилению ангиогенеза и репарации ткани, уменьшает образование фиброзной ткани (Carlan et al., 2009; Prockop et al., 2009). Кроме того, ККМ обладают противовоспалительным и иммуномодулирующим действием, а также активируют тканеспецифические прогениторные клетки. Имеются экспериментальные доказательства защитного действия трансплантированных ККМ, полученные на экспериментальных моделях повреждения сердечной мышцы (Alaiti et al., 2010). Наши данные подтверждают факт стимулирующего влияния трансплантированных ККМ на пролиферацию децидуальных клеток в экспериментальной модели псевдобеременности у крыс.

Таким образом, трансплантация ККМ в матку при ложной беременности у крыс обнаружила их стимулирующее влияние на развитие децидуальной оболочки. Это открывает дальнейшие перспективы для детального изучения влияния стволовых ККМ и других мезенхимных стволовых клеток на функциональное состояние эндометрия.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского фонда фундаментальных исследований (КИАС, проект 14-04-00259).

Список литературы

- Должиков А. А. 2007. Морфология последа человека. Белгород. 41 с. (*Dolzhikov A. A. 2007. Morphology of a human placenta. Belgorod. 41 p.*)
- Михайлов В. М. 1998. Жизненный цикл децидуальных клеток: Автореф. докт. дис. СПб. 54 с. (*Mikhailov V. M. 1998. Life cycle of decidual cells. Abstract doc. thesis St. Petersburg. 54 p.*)
- Aghajanova L., Horcajadas J. A., Esteban F. J., Giudice L. C. 2010. The bone marrow-derived human mesenchymal stem cell: potential progenitor of the endometrial stromal fibroblast. *Biol. Reprod.* 82 : 1076—1087.
- Alaiti M. A., Ishikawa M., Costa M. A. 2010. Bone marrow and circulating stem/progenitor cells for regenerative cardiovascular therapy. *Transl. Res.* 156 : 112—129.
- Caplan A. I. 2009. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J. Pathol.* 217 : 318—324.
- Cervelló I., Gil-Sanchis C., Mas A., Faus A., Sanz J., Moscardó F., Higuera G., Sanz M. A., Pellicer A., Simón C. 2012. Bone marrow-derived cells from male donors do not contribute to the endometrial side population of the recipient. *PLoS One.* 7 : 230—260.
- Domnina A. P., Zemelko V. I., Mikhailov V. M., Nikolsky N. N. 2013. Stimulation of decidua development by transplantation of endometrial stem cells. *J. Biomed. Sci. Eng.* 6 : 59—65.
- Du H., Taylor H. S. 2007. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells.* 25 : 2082—2086.
- Gargett C. E. 2007. Uterine stem cells: what is the evidence? *Hum. Reprod. Update.* 13 : 87—101.
- Mikhailov V. M. 2003. Life cycle of decidual cells. *Int. Rev. Cytol.* 227 : 1—63.
- Morelli S.S., Rameshwar P., Goldsmith L. T. 2013. Experimental evidence for bone marrow as a source of nonhematopoietic endometrial stromal and epithelial compartment cells in a murine model. *Biol. Reprod.* 89 (1) : 1—7.
- Nagori C. B., Panchal S. Y., Patel H. 2011. Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by *in vitro* fertilization in a patient of severe Asherman's syndrome. *J. Hum. Reprod. Sci.* 4 : 43—48.
- Panayiotides I., Weyers S., Bosteels J., Van Herendael B. 2009. Intrauterine adhesions (IUA): has there been progress in understanding and treatment over the last 20 years? *Gynecol. Surg.* 6 : 197—211.
- Prockop D. J. 2009. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol. Ther.* 17 : 939—946.
- Taylor H. S. 2004. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA.* 292 : 81—85.

Поступила 24 I 2014

EFFECT OF BONE MARROW CELLS TRANSPLANTATION ON THE DECIDUA FORMATION IN PSEUDOPREGNANT RATS

A. P. Domnina,¹ V. M. Mikhailov,¹ N. N. Nikolsky^{1, 2}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and ² St. Petersburg State Polytechnical University;

* e-mail: aldonna@mail.ru

One of the most common causes of the current pregnancy loss is the failure of the decidual reaction of endometrial cells. It is assumed that a partial source of decidual cells in endometrial tissue is bone marrow cells (BMCs). In the present work, we have studied possible effect of BMCs transplantation on the process of decidualization using the model of pseudopregnancy in rats. BMCs were flushed from the rat femurs and tibias. The

obtained suspension of single BMCs was injected into one of rat uterine horns on the 5th day of pseudopregnancy. PBS without cells was injected into the contralateral horn served as the control. Rats were sacrificed on the 11th day of pseudopregnancy. Decidua formed in the experimental uterine horn showed an increase in the meso-antimezometral direction of their diameter of about 1.5—2 times as compared with a control horn. The weight of decidual tissue in the experimental horn exceeded 3 times the weight of the control one. The presence of transplanted BMCs in decidual tissue was documented by preliminary double staining of BMCs with membrane dye PKH 26 Red and nuclear dye Hoechst 33342. Histological analysis of decidua sections after transplantation revealed any alterations neither in cell differentiation nor in tissue structure. We conclude that BMCs transplantation stimulates decidualization in animals.

Key words: decidual tissue, decidual cells, bone marrow stem cells, pseudopregnancy.
