

## ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРЫ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТКИ С АДЕНОМИОЗОМ

© М. А. Шилина,<sup>1</sup> А. П. Домнина, И. В. Кожухарова,  
В. В. Зенин, С. В. Анисимов, Н. Н. Никольский, Т. М. Гринчук

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

<sup>1</sup> электронный адрес: shili-mariya@yandex.ru

Аденомиоз — одна из форм эндометриоза, распространенного заболевания женской репродуктивной системы, которое может приводить к бесплодию у женщин. Цель настоящей работы — исследовать изменения эндометриальных мезенхимных стволовых клеток (эмСК) от больной аденомиозом. Задача работы состояла в получении клеточной линии эмСК от донора с аденомиозом и ее характеристике по сравнению с эмСК от здорового донора. Анализ полученной линии эмСК от донора с аденомиозом показал, что по фибробластоподобной морфологии, дифференцировке в адипогенном направлении, экспрессии маркеров мезенхимного ряда и отсутствию экспрессии маркеров гемопоэтического ряда эти клетки не отличались от эмСК, полученных от здорового донора. Цитогенетический анализ эмСК (6—7-го пассажа), окрашенных дифференциально на G-диски метафазных хромосом, показал, что эмСК от здорового донора преимущественно имели нормальный неперестроенный кариотип. В популяции эмСК от пациентки с диагнозом аденомиоз доминировало число клеток с нарушениями структуры кариотипа. Выявленные изменения были связаны с анеуплоидизацией клеточной популяции и наличием неслучайных хромосомных поломок, чаще всего маркирующих хромосомы 7 и 11. Анализ полученных данных позволяет заключить, что аденомиозные клетки на фоне физиологической стабильности характеризуются повышенной нестабильностью структуры кариотипа с неслучайным вовлечением в перестройки определенных хромосом набора. Но, несмотря на то что в клетках от донора с аденомиозом присутствуют признаки дестабилизации генома, типичные при клеточной трансформации, аденомиозные клетки к 26-му пассажу перестают делиться и входят в фазу репликативного старения. Это позволяет сделать вывод о том, что обнаруженные нами кариотипические изменения аденомиозных клеток не приводят к их трансформации и иммортализации в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: эндометриальные мезенхимные стволовые клетки, аденомиоз, эндометриоз, кариотип, хромосомные изменения, поломки хромосом.

Принятые сокращения: эмСК — эндометриальные мезенхимные стволовые клетки, SA-β-Gal — ассоциированная со старением β-галактозидаза.

Аденомиоз — одна из форм эндометриоза, распространенного заболевания женской репродуктивной системы, которое может приводить к бесплодию у женщин (Matalliotakis et al., 2003; Missmer, Cramer 2003; De Hondt et al., 2005; Hompes, Mijatovic, 2007; Керкер et al., 2007; Maheshwari et al., 2012). Это заболевание характеризуется моноклональным ростом клеток и может иметь признаки злокачественного роста, включая локальные инвазии и метастазирование (Gaetje et al., 1995; Jimbo et al., 1997; Sharpe-Timms, 1997). Некоторые исследования показывают, что эндометриоз является заболеванием множественной этиологии, обусловленной наследственными, гормональными, иммунологическими, экологическими и другими факторами (Olive, Schwartz, 1993; Brinton et al., 1997). Эпидемиологические исследования выявили семейную тенденцию этого заболевания (Ranney, 1971; Malinak et al., 1980; Simpson et al., 1980; Lamb et al., 1986; Moen, Magnus, 1993; Moen, 1994), что свидетельствует о его наследственном характере.

В настоящее время известно, что клетки, выделенные из очагов эндометриоза, характеризуются генетической

нестабильностью на уровне кариотипа. Основными типами изменений являются появление анеуплоидных клеток и наличие морфологических изменений на уровне хромосом, что характерно для процесса клеточной трансформации. В ряде работ показано, что в перестройки вовлекаются определенные хромосомы кариотипического набора. Так, при изучении эндометриозных клеток различной локализации показано, что на фоне общей кариотипической дестабилизации наиболее часто в перестройки (делеции, дупликации, транслокации) вовлекается материал хромосом 7 и 11 (Bouquet de Jolinière et al., 1997; Gogusev et al., 2000; Korner et al., 2006). Несмотря на то что аденомиоз является одной из форм эндометриоза, мы нашли всего 2 работы посвященные исследованию генетики аденомиоза (Pandis et al., 1995; Wang et al., 2002).

Эндометриальные мезенхимные стволовые клетки (эмСК), выделенные из десквамированного эндометрия менструальной крови, легко доступны, имеют высокий пролиферативный потенциал, неприхотливы и относительно генетически стабильны при культивировании *in vitro*, что делает их перспективным объектом для изуче-

ния. Получение и характеристика клеточных линий ЭМСК от больных разными формами эндометриоза, в том числе аденомиозом, могут помочь оценить степень изменений в структуре их клеточного генома.

Анализ нескольких клеточных линий ЭМСК из менструальной крови здоровых доноров, проведенный нами ранее, показал, что к 10-му пассажиру они имеют нормальный перестроенный кариотип, а отклонения от нормы носят случайный характер и связаны с изменением копийности (моносомией, трисомией) тех или иных хромосом или (в отдельных случаях) с появлением редко встречающихся случайных хромосомных перестроек (Земелько и др., 2011; Домнина и др., 2013).

Цель настоящей работы — исследовать изменения ЭМСК от больной аденомиозом. Задача работы состояла в получении клеточной линии ЭМСК от донора с аденомиозом, ее характеристике и сравнении с ЭМСК от здорового донора.

### Материал и методика

Биологический материал для выделения ЭМСК получали из менструальной крови (2-й день цикла) больной аденомиозом. Забор крови проводили на базе Научно-исследовательского института акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта (Санкт-Петербург). Выделенную кровь помещали в фосфатно-солевой буферный раствор (PBS; Sigma, США), содержащий цитрат натрия и 10 % смеси антибиотика с антимикотиком (смесь пенициллина, стрептомицина и амфотерина; Sigma, США). Кровь центрифугировали при 1500 g 5 мин, супернатант удаляли, осадок, содержащий фрагменты эндометриальной ткани, пипетировали, добавляли тот же раствор PBS и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Затем смесь снова центрифугировали, осадок пипетировали в культуральной среде и помещали в чашки Петри.

Клетки, способные к пересевам и сохраняющие свою жизнеспособность в условиях *in vitro*, дали начало новой линии клеток, обозначенной нами 04-04. Для поддержания клеточной культуры использовали среду DMEM/F12 (Биолот, Россия), содержащую 10 % бычьей эмбриональной сыворотки (FBS; HyClone, США), 1 % смеси антибиотика с антимикотиком (PenStrep, Gibco, США) и 1 % глутамакса (Gibco, США). При пересеве клеток использовали 0.05%-ный раствор трипсина и EDTA (Invitrogen, США).

Активность пролиферации клеток оценивали с помощью кривых роста. Для их построения в 3-сантиметровые чашки высевали по 100 тыс. клеток и культивировали в среде DMEM/F12 (см. выше). В течение 6 сут через каждые 24 ч после посева клетки снимали со дна чашек и считали в камере Горяева. Среднее время удвоения популяции рассчитывали по формуле  $T_d = t \cdot (\lg 2 / \lg(N_t / N_0))$ , где  $t$  — время прироста популяции,  $N_t$  — число клеток через время  $t$ ,  $N_0$  — исходное число клеток.

Иммунофенотипирование. Для подтверждения мезенхимного происхождения культивируемых клеток (04-04) проводили иммунофенотипический анализ на CD-маркеры. Для этого клеточную суспензию помещали в раствор PBS, содержащий 5 % FBS, и добавляли набор антител, конъюгированных с FITC (против CD34, CD44, CD45, CD90 и CD 130) или меченных флуорофором фикоэритрином (PE) (CD13, CD19, CD29, CD73, CD105, CD117 и HLA-DR). Анализ проводили с использованием

проточного цитофлуорометра Epics XL (Beckman Coulter, США).

Для подтверждения мультипотентного статуса клеток 04-04 их дифференцировали в адипогенном направлении. Для этого клетки ( $2 \cdot 10^4$  кл./см<sup>2</sup>) высевали на чашки, покрытые 0.1%-ным желатином (Sigma, США). После достижения 80%-ного субмонослоя обычную ростовую среду DMEM/F12 заменяли на дифференцировочную DMEM/F12, содержащую 10 % бычьей эмбриональной сыворотки, 1 % смеси антибиотика с антимикотиком, 1 % глутамакса, 1 мМ дексаметазона (Sigma, США), 0.5 мМ изобутилметилксантина (Sigma, США), 10 мкг/мл рекомбинантного инсулина человека (Sigma, США) и 100 мМ индометацина. Клетки культивировали в этой среде в течение 6 сут со сменой половины среды каждые 2 сут, после чего переводили на обычную культуральную среду (на 2 сут), содержащую 10 мкг/мл инсулина для поддержания их жизнеспособности. Клетки дифференцировали в течение 5 нед. После этого клетки фиксировали 10%-ным формальдегидом в течение 1 ч. Жировые капли окрашивали красителем Oil Red (Sigma, США) согласно протоколу фирмы-производителя.

Для иммунофлуоресцентного анализа на нестин и бета-III-тубулин клетки выращивали на покровных стеклах и фиксировали 4%-ным раствором формалина и пермеабилizировывали 0.2—0.5%-ным раствором Тритона X-100. Блокирование неспецифического связывания осуществляли с помощью 1%-ного раствора бычьего сывороточного альбумина на PBS в течение 30 мин. В качестве первых антител использовали мышинные моноклональные антитела против бета-III-тубулина (в разведении 1:1000) и кроличьи поликлональные антитела против нестина (1 : 100), в качестве вторых антител — козы антимышинные антиглобулины CY3 (1 : 300) и козы антикроличьи антитела, конъюгированные с CY2 (1 : 300). Ядра окрашивали раствором DAPI (1 мкг/мл; Merk, США). После окраски покровные стекла с клетками заключали в фиксирующий раствор (Life Technologies, США). Анализ препаратов проводили под микроскопом Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия) при увеличениях объектива 40× и 100× и фотографировали камерой Leica DFC 420C (Германия).

Криоконсервацию клеток выделенной линии 04-04 проводили по обычной схеме: клетки открепляли от поверхности флаконов 0.05%-ным раствором трипсина с EDTA, помещали в культуральную среду и центрифугировали. Супернатант удаляли, осевшие клетки ресуспендировали в растворе 90%-ной бычьей FBS, содержащей 10 % DMSO (Sigma, США), и переносили в криовials (Nunc, США). Материал подвергали глубокой заморозке со скоростью 1 °С/мин и хранили в жидком азоте. Для разморозки ампулу с клетками быстро нагревали на водяной бане при 37 °С, клетки отмывали от DMSO в теплой ростовой среде, клеточную суспензию центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали, добавляли культуральную среду и переносили во флаконы для дальнейшего культивирования.

Для выявления активности фермента SA-β-Gal, который является маркером клеточного старения, клетки (по 100 тыс.) высевали в 3-сантиметровые чашки и культивировали. Через 3 сут после посева среду удаляли, клетки промывали раствором PBS и фиксировали 4%-ным раствором формальдегида. Окраску проводили с помощью специального набора реактивов Senescence-galactosidase staining kit (Cell Signaling, США). Все

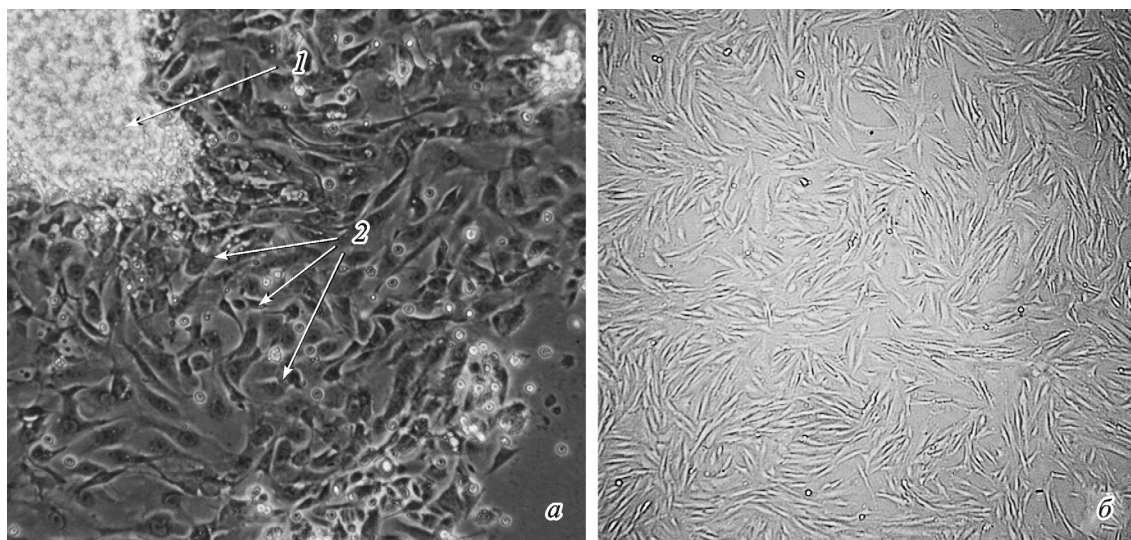


Рис. 1. Клетки от донора с аденомиозом на 5-е сут культивирования *in vitro* (а) и фибробластоподобная морфология линии (04-04) этих клеток (б).

а: 1 — фрагмент эндометриальной ткани; 2 — клетки, появляющиеся из фрагмента эндометриальной ткани и адаптирующиеся к условиям *in vitro*.

процедуры проводили в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Активность SA-β-Gal оценивали визуально под световым микроскопом по появлению синих гранул в цитоплазме клеток.

Кариотипический анализ. Для получения препаратов метафазных хромосом клетки рассеивали с плотностью 14—15 тыс. кл./см<sup>2</sup>. Через 24 ч половину питательной культуральной среды заменяли на свежую, тем самым стимулируя их к делению. Через 23—25 ч для накопления клеток в стадии метафазы в культуральную среду вводили митостатик колцемид (10 мг/мл; Sigma, США). Время действия колцемида подбирали экспериментально. Затем культуральную среду удаляли, клетки открепляли от пластика, суспензию центрифугировали, осадок ресуспендировали и проводили гипотоническую обработку 0.56%-ным раствором KCl, время подбирали экспериментально. Затем клетки фиксировали на холоде (–20 °С) смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1) (3 смены фиксатора, общее время фиксации 1.5 ч). Фиксированный материал раскапывали на холодные и влажные предметные стекла. Препараты в течение 1 нед высушивали при комнатной температуре, после чего метафазные пластинки окрашивали дифференциально на G-диски красителем Гимза (Fluka, США). Препараты метафазных пластинок с хорошим разбросом метафазных хромосом анализировали под световым микроскопом Axioscop (Carl Zeiss, Германия) при увеличениях объектива 20× и 100×. Хромосомы идентифицировали в соответствии с Атласом хромосом человека (Мамаева, 2002). Для определения частоты встречаемости полиплоидных клеток анализировали не менее 500 метафазных пластинок.

## Результаты

Из полученного образца менструальной крови, содержащего фрагменты десквамированного эндометрия, была выделена клеточная линия, условно обозначенная нами 04-04. На рис. 1, а показано, как на 4—6-е сут поддержания биологического материала в культуре из фрагмента

эндометриальной ткани стали выплывать отдельные клетки. В процессе дальнейшего культивирования эти клетки приобретают типичную фибробластоподобную морфологию и образуют монослой (рис. 1, б). Активность пролиферации клеток в системе *in vitro* оценивали с помощью кривых роста (не показаны) на разных этапах культивирования. По кривым роста определяли время удвоения популяции, которое составляло 22—23 ч на ранних этапах культивирования (6-й пассаж) и 45—47 ч на поздних этапах (17-й пассаж). Идентификацию клеточного старения проводили по определению активности фермента SA-β-gal. По мере культивирования количество клеток с синими гранулами в цитоплазме (SA-β-gal-позитивных) увеличивается и к 25—28-му пассажу достигает 100 %.

Цитометрическое фенотипирование показало, что выделенные клетки (04-04) экспрессировали поверхностные маркеры мезенхимного ряда, а именно CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 и CD105 и не экспрессировали гемопоэтические маркеры: CD19, CD34, CD45, CD117, CD130 и HLA-DR класса 2. Эти результаты свидетельствуют о том, что полученные нами клетки линии 04-04 являются эндометриальными мезенхимными стволовыми клетками. Известно, что ЭМСК десквамированного эндометрия могут быть дифференцированы в 9 типов клеток трех зародышевых листков: мезодерму (костные, хрящевые, мышечные клетки, клетки сухожилий и связок), эктодерму (нейроны, астроциты и клетки эпидермиса) и энтодерму (печеночные, кишечные, панкреатические и легочные клетки) (Meng et al., 2007; Мусина и др., 2008). Иммуноцитохимический анализ клеток линии 04-04 выявил экспрессию маркера ранних нейрональных предшественников — нестина (рис. 2, а) и маркера поздних нейрональных предшественников — бета-III-тубулина (рис. 2, б). По данным из литературы, экспрессия этих маркеров свидетельствует о предрасположенности ЭМСК к дифференцировке в нейрональном направлении. Положительный результат направленной дифференцировки клеток линии 04-04 в адипогенном направлении (рис. 2, в) позволил говорить об их мультипотентном статусе.

Кариотипический анализ метафазных хромосом клеток линии 04-04 выявил, что 90 % клеток имеют наруше-

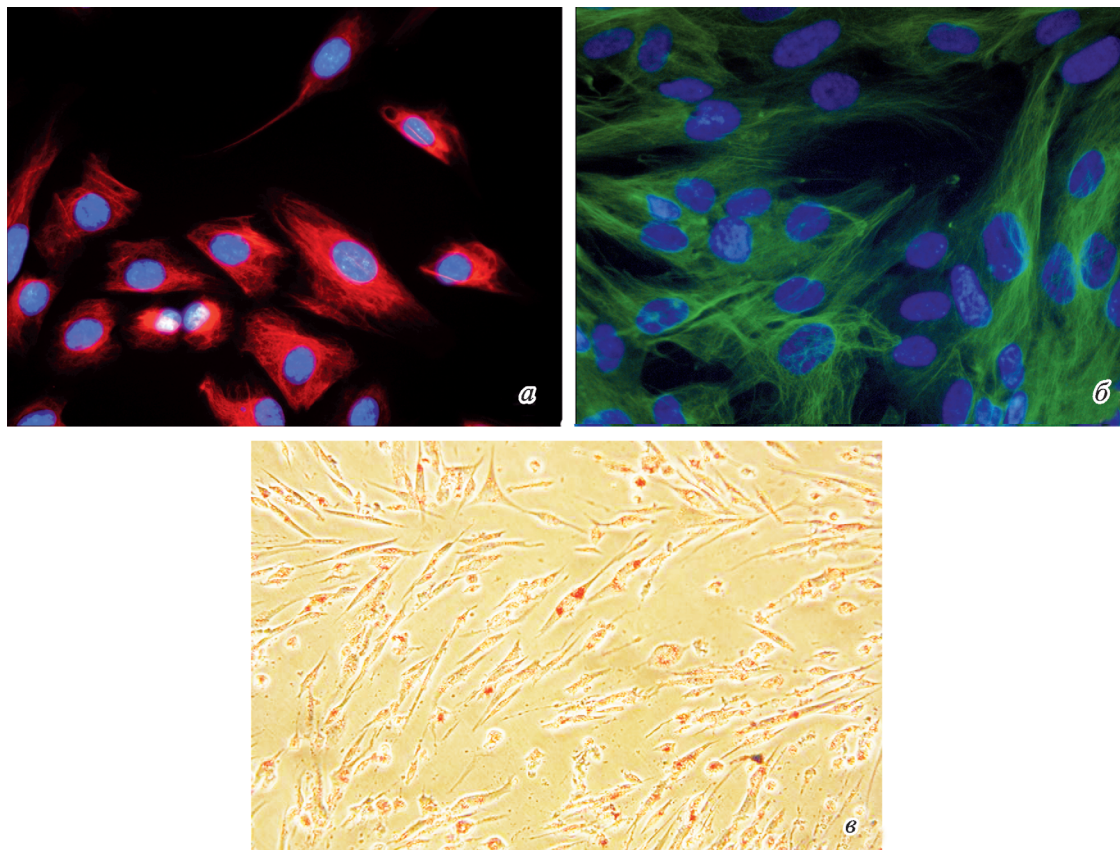


Рис. 2. Экспрессия клеткам линии 04-04, полученными от донора с аденомиозом, маркеров нейрональных предшественников (а, б), и направленная дифференцировка этих клеток в адипогенном направлении (в).

а, б — экспрессия нестина (маркера ранних нейрональных предшественников) и бета-III-тубулина (маркера поздних нейрональных предшественников; ядра окрашены DAPI. в — жировые вакуоли в клетках окрашены красителем Oil Red. Об. 40× (а, б) и 20× (в).

ния структуры кариотипа (как по числу хромосом, так и по наличию хромосомных aberrаций). Изменение числа копий неоднократно наблюдали в определенных хромосомах набора: трисомию — в хромосомах 1, 3, 6, 7 и 21; моносомию — в хромосомах 5, 11, 15—17. Основным типом морфологических изменений в структуре кариотипа ЭМСК от пациентки, больной аденомиозом, были поломки хромосомного материала с возникновением дефектных хромосом (рис. 3). На фоне повышенной морфоло-

гической нестабильности наиболее часто встречаемые неслучайные поломки затрагивали хромосомы 7 и 11 (табл. 1).

Сравнительный анализ данных для ЭМСК (04-04), полученных от донора с аденомиозом, и ЭМСК от здорового донора, полученных и охарактеризованных нами ранее (Домнина и др., 2013), показал, что аденомиозные клетки линии 04-04 по таким признакам, как морфология, активность пролиферации, фенотипический профиль (анализ

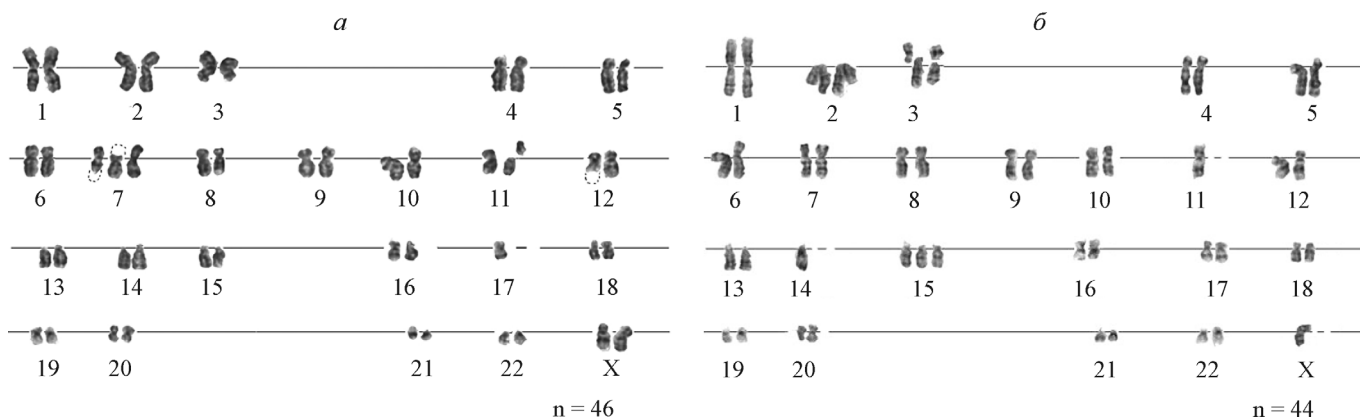


Рис. 3. Кариотип ЭМСК (линия 04-04) от донора с аденомиозом.

а — прицентромерные поломки в хромосомах 7 и 11, дистальная поломка в хромосоме 12, моносомия хромосомы 17; б — прицентромерные поломки в двух гомологах хромосомы 3, моносомия хромосом 11, 14 и X, трисомия хромосомы 15.

Таблица 1

Частота встречаемости хромосомных aberrаций эмСК

Хромосома	Аберрация									
	эмСК (04-04) от донора с аденомиозом					эмСК от здорового донора				
	поломки	трисомия	моносомия	отсутствие двух гомологов	изохромосома	поломки	трисомия	моносомия	отсутствие двух гомологов	изохромосома
1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
3	3	1	0	0	0	0	1	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
7	5	1	0	0	0	0	1	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	5	0	3	0	0	0	0	1	0	0
12	2	0	0	1	0	0	0	2	0	0
13	0	0	2	0	0	0	0	2	0	4
14	0	0	3	0	0	0	0	1	0	2
15	0	1	3	0	0	0	0	0	0	1
16	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0
17	1	0	4	0	0	1	0	1	0	0
18	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
19	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
X	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0

Примечание. Для эмСК линии 04-04 проанализировано 15 метафаз, для эмСК от здорового донора — 21 метафаза.

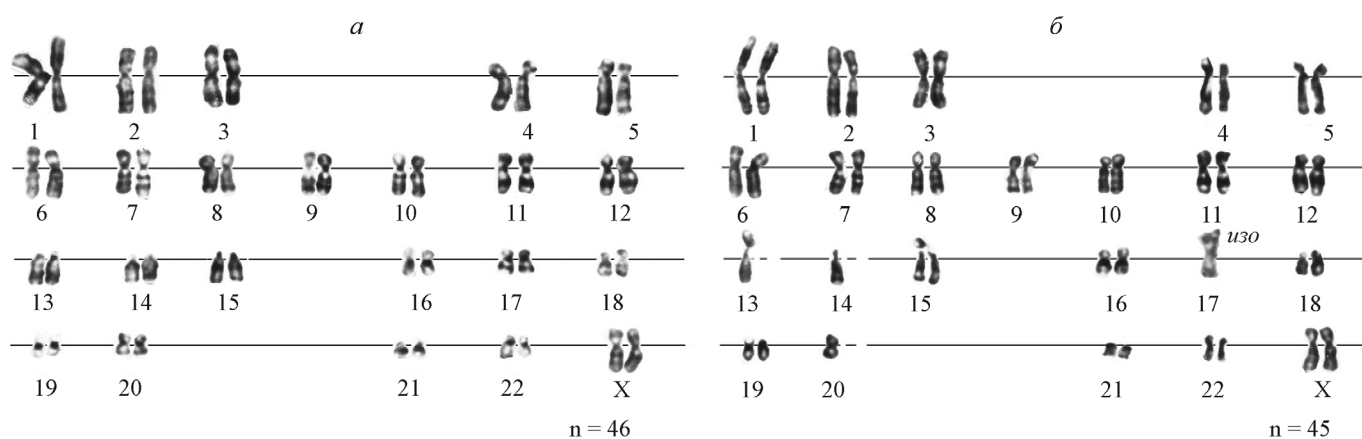


Рис. 4. Кариотип эмСК от здорового донора.

а — норма, морфологических изменений нет; б — эктопическая конъюгация между хромосомами 13/22, 15/21 и изохромосома (17, *изо*).

Частота встречаемости хромосомных поломок в ЭМСК

ЭМСК	Частота поломок каждой хромосомы, %																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
04-04 (аденомиз)	0.9	20	13.3	6.7	0	0	40	0	6.7	0	46.7	13.3	0	6.7	0	6.7	6.7	6.7	0	6.7	0	0	0
От здорового донора	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.6	0	0	0	0	0	0	0

на CD-маркеры), экспрессия нестина и бета-III-тубулина (маркеров нейрональных предшественников), а также способность к направленной дифференцировке в адипогенном направлении не отличались от клеток здорового донора. По цитогенетическим признакам были выявлены определенные различия. Клетки от больного донора характеризовались усилением кариотипической нестабильности, сопровождающейся вовлечением в этот процесс определенных хромосом набора. ЭМСК от здорового донора преимущественно имели нормальный кариотип (рис. 4, а), отклонения от нормы носили случайный характер и были связаны с изменением копийности тех или иных хромосом набора (моносомией, трисомией) и появлением таких хромосомных перестроек, как изохромосомы и Робертсоновские транслокации (рис. 4, б). В кариотипе ЭМСК от здорового донора поломки хромосомного материала отсутствовали (табл. 2).

### Обсуждение

Из данных литературы известно, что клетки, выделенные из очагов эндометриоза, характеризуются генетической нестабильностью на уровне кариотипа. К основным изменениям относятся появление анеуплоидных клеток и наличие морфологических изменений на уровне хромосом, которые характеризуют процесс клеточной трансформации. Так, швейцарские исследователи показали, что при эндометриозе яичников, эндометриозной аденокарциноме, а в редких случаях и в нормальном эндометрии одними из наиболее часто встречающихся изменений в клетках являются трисомия хромосом 1 и 7 и моносомия хромосом 9 и 17. Частота встречаемости этих изменений увеличивалась по мере развития заболевания (Korner et al., 2006). Французские ученые, работая с клеточной линией, полученной из перитонеального очага эндометриоза IV стадии, с помощью R-бэндинга обнаружили, что клетки имеют многочисленные хромосомные aberrации, в том числе потерю одного из гомологов X, 4q, 5q, трисомию по хромосомам 7, 8 и 10 и тетрасомию по хромосомам 17—20 (Bouquet de Jolinière et al., 1997). Японские ученые показали, что анеуплоидия по хромосоме 17 в клетках, выделенных из очагов эндометриоза, оказалась значительно больше, чем в клетках от здорового донора (Kosugi et al., 1999). Хотя эндометриоз почти всегда является доброкачественным заболеванием, в 1997 г. было обнаружено злокачественное преобразование этих клеток (Fukunaga et al., 1997; Jimbo et al., 1997).

Анализ клеток эндометриальной стромальной саркомы (злокачественные опухоли миомы и первичные саркомы матки), проведенный японскими исследователями с применением FISH-анализа, выявил кариотипические из-

менения, связанные с неслучайным вовлечением в перестройки хромосомы 17 (Satoh et al., 2003). Мутации в хромосоме 17 описаны при изучении структуры кариоти-па в предраковых и злокачественных тканях эндометриальной карциномы, маточной серозной карциномы, раке яичников (McManus et al., 1994; Kihana et al., 1995; Tashiro et al., 1997).

Стоит отметить, что наша работа была выполнена на стволовых клетках в культуре, выделенных из очага аденомиоза. Работ, посвященных генетике аденомиоза (эндометриоза) и выполненных на ЭМСК, в настоящее время в литературе нет. Полученная нами клеточная линия аденомиозных ЭМСК была полностью охарактеризована в процессе культивирования, что было сделано впервые. По результатам проведенного анализа выделенной аденомиозной линии ЭМСК первое, что необходимо отметить, это рост числа анеуплоидных вариантов с наличием в кариотипе как моносомиков, так и трисомиков. В одних случаях моносомия по той или иной хромосоме кариотипического набора носила случайный характер. В других случаях трисомия или моносомия определенных хромосом встречалась неоднократно (трисомия хромосом 1, 3, 6, 7 и 21; моносомия хромосом 5, 11, 15—17). Другая сторона усиления кариотипической нестабильности аденомиозных клеток — повышенная ломкость определенных хромосом набора, приводящая к возникновению дефектных хромосом. В ЭМСК 04-04 неоднократные поломки были обнаружены нами в хромосомах 7 и 11. Аналогичная генетическая нестабильность хромосомы 7 (del (7)(q21.2q31.2)) была обнаружена ранее греческими учеными при анализе первичных культур от трех пациентов с диагнозом аденомиоз (Pandis et al., 1995). Между тем делеция хромосомы 7 описана и в опухолевых клетках лейомиомы матки (Ozisk et al., 1993).

Повышенная ломкость хромосомы 11 с потерей *p*-плеча, обнаруженная нами в ЭМСК линии 04-04, была описана в эндометриозных клетках яичников (Gogusev et al., 1999). Японские ученые с помощью FISH-анализа клеток, выделенных из легочных метастазов эндометриальной стромальной саркомы, тоже показали кариотипические изменения (межхромосомные транслокации), связанные с хромосомами 7 и 11 (Satoh et al., 2003). Французские исследователи на клеточной линии, полученной из очага эндометриоза в яичнике, и на биопсийном материале той же пациентки провели сравнительный цитогенетический анализ с использованием классического кариотипирования, молекулярного кариотипирования и метода FISH (Gogusev et al., 2000). Анализ выявил множество хромосомных перестроек и в клеточной линии, и в клетках биопсийного материала, однако перестройка der(5)t(5;6)(q34;p11) и гомогенно окрашенная область (ГОО) на 1-й хромосоме встречались чаще всего (Gogusev et al., 2000).

Специальных работ, посвященных изучению особенностей мезенхимных клеток эндометрия при аденомиозе и их кариотипами, мало. Так, греческими исследователями проведен кариотипический анализ с использованием метода G-бандирования метафазных хромосом клеток, выделенных от трех доноров с диагнозом аденомиоз, через 5-6 сут после перевода клеток в культуру (Pandis et al., 1995). Во всех трех культурах была обнаружена морфологическая нестабильность хромосомы 7 (del(7)(q21.2q31.2)), которую авторы рассматривают как неслучайное кариотипическое изменение, связанное с этим заболеванием. С другой стороны, тайваньские ученые исследовали 25 замороженных образцов от разных пациенток с аденомиозом методом молекулярного кариотипирования и не обнаружили специфических кариотипических изменений в клетках (Wang et al., 2002).

Важно отметить, что большинство работ по изучению генетических особенностей эндометриозных (аденомиозных) клеток, имеющих в литературе, выполнено на биопсийном материале без культивирования клеток. Есть лишь несколько работ, в которых объектом для изучения служили клетки в системе *in vitro*, однако это были первичные культуры (Pandis et al., 1995) и трансформированная линия (Gogusev et al., 2000). Настоящая работа выполнена на линии ЭМСК. Однако наши данные по кариотипированию аденомиозных клеток согласуются с литературными, а их сопоставление с уже опубликованными позволяет говорить о том, что как хромосомная нестабильность (в частности, хромосом 7 и 11), так и анеуплоидизация клеточной популяции являются признаками не одного конкретного заболевания, в частности аденомиоза, а по меньшей мере разных форм эндометриоза. Принципиальных различий между аденомиозом и другими формами эндометриоза не выявлено.

Известно, что анеуплоидизация клеточной популяции и хромосомные aberrации — типичные признаки клеточной трансформации. Многие авторы связывают экстракопирование целых хромосом или отдельных их плеч с локализацией онкогенов, находящихся в составе экстракопированных локусов, а делеции и потери некоторых участков хромосом — с нахождением в этих участках ген-супрессоров опухолей. Так, в упомянутой выше работе Гогусева с соавторами (Gogusev et al., 2000) и в клетках полученной ими линии, и в клетках биопсийного материала обнаружено увеличение числа копий локуса бр24. Известно, что именно в этом локусе локализован один из генов-мишеней, а именно *NRASL3*, относящийся к протоонкогенам надсемейства *RAS*. Другими потенциальными генами-кандидатами в пределах бр24 могут быть ген металлоэндопептидазы *MEP1A* (Jiang et al., 1995), онкоген *PIMI* (Ziegler et al., 1990), гены *TNF-α* и *VEGFA*, расположенные в локусе бр21.3 (Honchel et al., 1996; Vincenti et al., 1996). С другой стороны, показано, что ген-супрессор, локализованный в плече бq, участвует в развитии эпителиальных опухолей яичников (Cliby et al., 1993; Osborne, Leech, 1994). Делеции в бq очень распространены на начальных этапах развития опухолей яичника всех гистологических типов и рассматриваются как ранние хромосомные aberrации в патогенезе овариальной неоплазии (Tibiletti et al., 1996).

Несмотря на то что выделенные нами ЭМСК (линия 04-04) из аденомиозной ткани имеют признаки дестабилизации генома, типичные для клеточной трансформации, остановка пролиферации ЭМСК к 26-му пассажу и начало фазы их репликативного старения позволяют

говорить о том, что кариотипические изменения не приводят к трансформации и иммортализации клеток в условиях *in vitro*. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что фундаментальные исследования в данном направлении могут помочь пониманию генетических механизмов возникновения гинекологических заболеваний данной направленности и быть полезны в разработке методов их диагностики и терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-01820) и Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

### Список литературы

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. 55 (1) : 69—74. (Domnina A. P., Fridlianska 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. Cell Tissue Biol. 55 : 69—74.)

Земелько В. И., Гринчук Т. М., Домнина А. П., Арцыбашева 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. 53 (12) : 919—929. (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. 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization and use as feeder layer for maintenance of human embryonic stem cell lines. Cell Tissue Biol. 53 : 919—929.)

Мусина Р. А., Белявский А. В., Тарусова О. В., Соловьева Е. В., Сухих Г. Т. 2008. Мезенхимные стволовые клетки эндометрия, полученные из менструальной крови. Кл. техн. биол. мед. 2:110—114. (Musina R. A., Bielawski A. V., Tarusova O. V., Solovieva E. V., Suchich G. T. 2008. Endometrial mesenchymal stem cells derived from menstrual blood. Kl. tehn.biол.med. (Russian). 2 : 110—114.)

Bouquet de Joliniere J., Validire P., Canis M., Doussau M., Levardon M., Gogusev J. 1997. Human endometriosis-derived permanent cell line (FbEM-1): establishment and characterization. Hum. Reprod. Update. 3 : 117—123.

Brinton L. A., Gridley G., Persson I., Baron J., Bergqvist A. 1997. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. Amer. J. Obstetrics Gynecol. 176 : 572—579.

Cliby W., Ritland S., Hartmann L., Dodson M., Halling K. C., Keeney G., Podratz K. C., Jenkins R. B. 1993. Human epithelial ovarian cancer allelotyping. Cancer Res. 53 : 2393—2398.

De Hondt A., Peeraer K., Meuleman C., Meeuwis L., De Loecker P., D'Hooghe T. M. 2005. Endometriosis and subfertility treatment: a review. Minerva Ginecol. 57 : 257—267.

Fukunaga M., Nomura K., Ishikawa E., Ushigome S. 1997. Ovarian atypical endometriosis: its close association with malignant epithelial tumours. Histopathology. 30 : 249—255.

Gaetje R., Kotzian S., Herrmann G., Baumann R., Starzinski-Powitz A. 1995. Invasiveness of endometriotic cells *in vitro*. Lancet. 346 : 1463—1464.

Gogusev J., Bouquet de Joliniere J., Telvi L., Doussau M., du Manoir S., Stojkoski A. 1999. Detection of DNA copy number changes in human endometriosis by comparative genomic hybridization. Human Genetics. 105 : 444—451.

- Gogusev J., Bouquet de Joliniere J., Telvi L., Doussau M., du Manoir S., Stojkoski A., Levardon M. 2000. Genetic abnormalities detected by comparative genomic hybridization in a human endometriosis-derived cell line. *Mol. Human Reprod.* 6 : 821—827.
- Hompes P. G., Mijatovic V. 2007. Endometriosis: the way forward. *Gynecol. Endocrinol.* 23 : 5—12.
- Honchel R., McDonnell S., Schaid D. J., Thibodeau S. N. 1996. Tumor necrosis factor-alpha allelic frequency and chromosome allelic imbalance in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 56 : 145—149.
- Jiang W. P., Dewald G., Brundage E., Mucher G., Schildhaus H. U., Zerres K., Bond J. S. 1995. Fine mapping of MEP1A, the gene encoding the  $\alpha$  subunit of the metalloendopeptidase meprin, to human chromosome 6P21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216 : 630—635.
- Jimbo H., Yoshikawa H., Onda T., Yasugi T., Sakamoto A., Taketani Y. 1997. Prevalence of ovarian endometriosis in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Obstetrics.* 59 : 245—250.
- Kepkep K., Tunçay Y. A., Göynümer G., Tatal E. 2007. Transvaginal sonography in the diagnosis of adenomyosis: which findings are most accurate? *Ultrasound Obstetrics Gynecol.* 30 : 341—345.
- Kihana T., Hamada K., Inoue Y., Yano N., Zketan H., Muro S., Ukita M., Matsuura S. 1995. Mutation and allelic loss of the p53 gene in endometrial carcinoma incidence and outcome in 92 surgical patients. *Cancer.* 76 : 72—78.
- Korner M., Burckhardt E., Mazzucchelli L. 2006. Higher frequency of chromosomal aberrations in ovarian endometriosis compared to extragonadal endometriosis: a possible link to endometrioid adenocarcinoma. *Modern Pathol.* 19 : 1615—1623.
- Kosugi Y., Elias S., Malinak L. R., Nagata J., Isaka K., Takayama M., Simpson J. L., Bischoff F. Z. 1999. Increased heterogeneity of chromosome 17 aneuploidy in endometriosis. *Amer. J. Obstetrics Gynecol.* 180 : 792—797.
- Lamb K., Hoffmann R. G., Nichols T. R. 1986. Family trait analysis: a case control study of 43 women with endometriosis and their best friends. *Amer. J. Obstetrics Gynecol.* 154 : 596—601.
- Maheshwari A., Gurunath S., Fatima F., Bhattacharya S. 2012. Adenomyosis and subfertility: a systematic review of prevalence, diagnosis, treatment and fertility outcomes. *Human Reprod. Update.* 18 : 374—392.
- Malinak L. R., Buttrum V. C., Elias S., Simpson J. L. 1980. Heritable aspects of endometriosis. II. Clinical characteristics of familial endometriosis. *Amer. J. Obstetrics Gynecol.* 137 : 332—338.
- Matalliotakis I. M., Kourtis A. I., Panidis D. K. 2003. Adenomyosis. *Obstetrics Gynecol. Clinics North Amer.* 30 : 63—82.
- McManus D. T., Yap E. P. H., Maxwell P., Russell S. E. H., Toner P. G., McGee J. D. 1994. p53 expression, mutation, and allelic deletion in ovarian cancer. *J. Pathol.* 174 : 159—168.
- Meng X., Ichim T. E., Zchong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K. W., Thebaud B., Riordan N. H. 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J. Transl. Med.* 5 : 57—66.
- Missmer S. A., Cramer D. W. 2003. The epidemiology of endometriosis. *Obstetrics Gynecol. Clinics North Amer.* 30 : 1—19.
- Moen M. H. 1994. Endometriosis in monozygotic twins. *Acta Obstetrics Gynecol. Scand.* 73 : 59—62.
- Moen M. H., Magnus P. 1993. The familial risk of endometriosis. *Acta Obstetrics Gynecol. Scand.* 72 : 560—564.
- Olive D. L., Schwartz L. B. 1993. Endometriosis. *N. Engl. J. Med.* 328 : 1759—1769.
- Osborne R. J., Leech V. L. 1994. PCR allelotyping of human ovarian cancer. *Br. J. Cancer.* 69 : 429—438.
- Ozsisik Y. Y., Meloni A. M., Surti U., Sandberg A. A. 1993. Deletion 7q22 in uterine leiomyoma. A cytogenetic review. *Cancer Genet. Cytogenet.* 71 : 1—6.
- Pandis N., Karaiskos C., Bardi G., Sfikas K., Tserkezoglou A., Fotiou S., Heim S. 1995. Chromosome analysis of uterine adenomyosis detection of the leiomyoma-associated del(7q) in three cases. *Cancer Genet. Cytogenet.* 80 : 118—120.
- Ranney B. 1971. Endometriosis. IV. Hereditary tendency. *Obstetrics Gynecol.* 37 : 734—737.
- Satoh Y., Ishikawa Y., Miyoshi T., Mukai H., Okumura S., Nakagawa K. 2003. Pulmonary metastases from a low-grade endometrial stromal sarcoma confirmed by chromosome aberration and fluorescence *in situ* hybridization approaches: a case of recurrence 13 years after hysterectomy. *Virchows Arch.* 442 : 173—178.
- Sharpe-Timms K. L. 1997. Basic research in endometriosis. *Obstetrics Gynecol. Clinics North Amer.* 24 : 269—290.
- Simpson J. L., Elias S., Malinak L. R., Buttrum V. C. 1980. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Amer. J. Obstetrics Gynecol.* 137 : 327—331.
- Tashiro H., Isacson C., Levine R., Kurman R. J., Cho K. R., Hedrick L. 1997. P53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Amer. J. Pathol.* 150 : 177—185.
- Tibiletti M. G., Bernasconi B., Furlan D., Riva C., Trubia M., Buraggi G., Franchi M., Bolis P., Mariani A., Frigerio L., Capella C., Taramelli R. 1996. Early involvement of 6q in surface epithelial ovarian tumors. *Cancer Res.* 56 : 4493—4498.
- Vincenti V., Cassano C., Rocchi M., Persico M. G. 1996. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21. 3. *Circulation.* 93 : 1493—1495.
- Wang P. H., Shyong W. Y., Lin C. H., Chen Y. J., Li Y. F., Chao H. T., Yuan C. C. 2002. Analysis of genetic aberrations in uterine adenomyosis using comparative genomic hybridization. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 24 : 1—6.
- Ziegler A., Field L. L., Sakagushi A. Y. 1990. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 6. *Cytogenet. Cell Genet.* 55 : 118—121.

Поступила 18 VIII 2015

#### CHARACTERISTIC OF ENDOMETRIAL MESENCHYMAL STEM CELLS IN CULTURE OBTAINED FROM PATIENT WITH ADENOMYOSIS

M. A. Shilina,<sup>1</sup> A. P. Domnina, I. V. Kozhukharova, V. V. Zenin, S. V. Anisimov, N. N. Nikolsky, T. M. Grinchuk

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

<sup>1</sup> e-mail: shili-mariya@yandex.ru

Adenomyosis is form of endometriosis, common diseases of female reproductive system, which can lead to infertility in women. In this study we are obtained and characterized cell line endometrial mesenchymal stem cells from a patient with adenomyosis, and compare obtained cells with the cell line of healthy donor. Aim of this study was to assesses the extent of differences between cells from donor with adenomyosis and cells from healthy donor. Was established that compared lines had morphology like fibroblasts, were differentiated in adipocytes, were expressed mesenchymal markers and didn't expressed haematopoietic markers. Cytogenetic analysis of differentially stained metaphase chromosomes on G-banding (passage 6—7) showed that healthy do-



nor's cells had predominantly normal karyotype. The cellular line from a patient with diagnosis of «adenomyosis» had a lot of cells with changes in karyotype's structure. These changes were related with aneuploidy of cellular population and the presence non-random chromosomal breaks, often in chromosomes 7 and 11. Analysis of this data allows the cells from adenomyosis characterized physiological stability in culture and karyotypic instability with non-random involvement certain chromosomal set. The cellular line obtained from donor with adenomyosis showed signs destabilization of he genome, typical for cell transformation. Division of adenomyosis cells to the 26th passage is stopped and these cells entered into a phase of replicative aging. Based on this, we can conclude that founded karyotype's hanges do not lead to transformation and immortalization of cells *in vitro*.

Key words: endometrial mesenchymal stem cells, adenomyosis, endometriosis, karyotype, chromosomal changes, chromosomal breakage.

---