

## СЫВОРОТКА МЕНСТРУАЛЬНОЙ КРОВИ ОКАЗЫВАЕТ ПРОТИВОФИБРОЗНОЕ ДЕЙСТВИЕ НА МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА

© Р. Ю. Еремичев,<sup>1,\*</sup> О. А. Макаревич,<sup>1</sup> Н. А. Александрушкина,<sup>1, 2</sup>  
К. Ю. Кулебякин,<sup>1, 2</sup> Д. Т. Дыйканов,<sup>2</sup> П. И. Макаревич<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр и

<sup>2</sup> Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, 119192;

\* электронный адрес: romaneremichev@gmail.com

Эндометрий женщин репродуктивного возраста обладает уникальной для человека способностью к эпиморфной регенерации. Ключевой ее особенностью является этап заживления раны, который завершается не образованием рубца, а полным восстановлением нормальной структуры слизистой оболочки матки. Участие мезенхимных стромальных клеток эндометрия (эмСК) в ранозаживлении может быть обусловлено особенностями окружения, формируемого во время менструации. Менструальная кровь выделяется из раны в течение всего периода заживления, поэтому мы сочли возможным использовать ее сыворотку для моделирования действия растворимой части этого окружения на эмСК. Контролем служила сыворотка периферической крови (СПК). Сыворотка менструальной крови (СМК) влияла на пролиферацию и морфологию эмСК, а также специфично снижала уровень экспрессии  $\alpha$ -гладкомышечного актина. Как СМК, так и СПК вызывали появление VE-кадгерина в эмСК, чего не наблюдали под действием фетальной бычьей сыворотки. Уровень E-кадгерина не зависел от используемых сывороток. Полученные результаты свидетельствуют о противofiброзном действии СМК на эмСК.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки эндометрия, сыворотка менструальной крови, фиброз.

Принятые сокращения: ГМК — гладкомышечные клетки, МСК — мезенхимные стромальные клетки, СМК — сыворотка менструальной крови, СПК — сыворотка периферической крови, ФБС — фетальная бычья сыворотка, эмСК — мезенхимные стромальные клетки эндометрия,  $\alpha$ -SMA —  $\alpha$ -гладкомышечный актин, CD — кластер дифференцировки.

Слизистая оболочка матки (эндометрий) женщины репродуктивного возраста обладает уникальным регенеративным потенциалом, благодаря которому происходит ее полное восстановление после родов, хирургических вмешательств и острых воспалительных заболеваний (Maubin et al., 2015). Такая регенерация имеет очень много общего с эпиморфозом, который, как правило, не свойствен млекопитающим и человеку. Термин впервые был предложен Томасом Хантом Морганом в 1901 г. для обозначения «случаев регенерации, в которых пролиферация материи предшествует образованию новой части». Классическим примером эпиморфоза служит регенерация ампутированной конечности амфибии. После быстрого ранозаживления, не сопровождаемого образованием рубца, она отрастает заново (McCusker et al., 2013).

В организме человека регенерация, как правило, происходит путем компенсаторной гипертрофии и (или) гиперплазии, когда сохраненная часть поврежденного органа увеличивается в размере, замещая утраченную (Stocum, 2012). Ключевым отличием ее от эпиморфоза является механизм заживления раны, который завершается образованием рубца и не приводит к восстановлению

нормальной структуры органа в зоне повреждения. В этой связи вызывают интерес события, происходящие со слизистой оболочкой матки во время менструации. В первые 2 сут полностью отторгается функциональный слой эндометрия. Образованная раневая поверхность представляет собой кровотокающую стому базального слоя, расположенную между сохраненными основаниями эндометриальных желез. В следующие 48—72 ч происходит полное восстановление нормальной структуры слизистой оболочки матки, не сопровождаемое ни рубцеванием, ни фиброзированием (Garry et al., 2009).

Все больше данных свидетельствует о том, что мезенхимные стромальные клетки эндометрия (эмСК) активно участвуют в ранозаживлении (Patterson et al., 2013). Способность хорошо переносить неблагоприятные условия во время менструации отчасти определила возможность их выделения из менструальной крови и культивирования *in vitro* (Мусина и др., 2008). эмСК обладают иммунофенотипом мезенхимных стромальных клеток (МСК) и дифференцируются в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях, но по сравнению с МСК жировой ткани или костного мозга быстрее проли-

феррируют, выдерживают значительно более долгие сроки культивирования и лучше образуют колонии (Meng et al., 2007). Также имеются различия в ангиогенном потенциале и иммуномодулирующих свойствах (Gargett et al., 2016).

При ранозаживлении эндометрия эмСК дифференцируются в неканонических направлениях. На трансгенных мышцах, несущих желтый флуоресцентный белок в стромальных клетках эндометрия, была показана дифференцировка последних в эпителий *in vivo* (Patterson et al., 2013). При культивировании над монослоем гладкомышечных клеток (ГМК) миометрия эмСК также дифференцируются в эпителиоциты и образуют структуры, напоминающие по морфологии эндометриальные железы (Fayazi et al., 2017). Установлено, что эмСК способны дифференцироваться в ГМК *in vitro* (Chen et al., 2016). Остается неизвестным, происходит ли данный процесс *in vivo*.

Участие эмСК в ранозаживлении эндометрия может быть обусловлено как собственными особенностями данного типа клеток, так и уникальностью окружения, формируемого во время менструации. В настоящей работе для выявления действия растворимой части этого окружения на эмСК мы использовали сыворотку менструальной крови.

## Материал и методика

Реактивы: ростовая среда DMEM/F-12 и ФБС (Gibco, США); раствор Хэнкса, раствор Версена и фосфатно-солевой буферный раствор (PBS; ПанЭко, Россия); йодиксанол (Alega Technologies AS, Норвегия); 100-кратный раствор пенициллина и стрептомицина и 0.25%-ный раствор трипсина (HyClone, США); набор для иммунофенотипирования МСК (Miltenyi Biotec, Германия); конъюгированные с фикоэритрином антитела к CD34 и CD146 и конъюгированные с фикоэритрином IgG мыши (BD Pharmingen, США); набор для измерения концентрации белка на основе бидинхониновой кислоты (Thermo Fisher Scientific, США), формальдегид и метанол (Panreac, Испания); неконъюгированные мышинные моноклональные антитела к виментину и винкулину человека, вторые антитела с пероксидазной меткой к тотальным IgG мыши и IgG кролика для Вестерн-блоттинга (Sigma-Aldrich, США); мышинные моноклональные антитела к  $\alpha$ -гладкомышечному актину; DAPI (DAKO, США); кроличьи поликлональные антитела к VE-кадгерину (SantaCruz, США); конъюгированные с AlexaFluor488 антитела против IgG мыши и конъюгированные с AlexaFluor594 антитела против IgG кролика (Invitrogen, США).

Выделение и культивирование эмСК. Клетки выделяли из 10—20 мл менструальной крови здоровых доноров ( $n = 3$ ), собранной на 2-е сут менструального цикла. Кровь разбавляли в 4 раза раствором Хэнкса, пропускали через фильтр 100 мкм и наносили фильтрат на поверхность (15 мл) 15%-ного йодиксанола. Центрифугировали 40 мин при 500 g. Собирали клетки, оставшиеся на поверхности йодиксанола, ресуспендировали их в растворе Хэнкса и центрифугировали 10 мин при 300 g. Полученный осадок ресуспендировали в полной среде роста DMEM/F-12, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и 1%-ный раствора пенициллина со стрептомицином. Полученную суспензию высаживали на пластик. Культивировали клетки в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Через 24 ч меняли среду на свежую. По

достижении 80—90%-ного конfluence клетки пассировали, для чего обрабатывали монослой раствором 0.05%-ного трипсина в течение 3 мин при 37 °C, полученную суспензию рассаживали в соотношении 1 : 3.

Имунофенотипирование эмСК. Для определения иммунофенотипа эмСК 4-го пассажа открепляли от поверхности пластика с помощью обработки сначала раствором Версена, затем 0.05%-ным трипсином. Клетки фиксировали 4%-ным формалином в течение 20 мин. После однократной отмывки PBS полученную суспензию с концентрацией 1 млн кл./мл разделяли на равные части. Полученные образцы инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре с антителами к CD73, CD90, CD105, CD34 и CD146. В качестве контроля использовали соответствующие изотипические IgG. После однократной отмывки PBS клетки анализировали с помощью проточного цитометра BD LSRFortessa (BD Biosciences, США).

Приготовление образцов сывороток менструальной крови (СМК) и сыворотки периферической крови (СПК). У доноров 1 и 2, от которых ранее были получены эмСК, на 2-й день менструального цикла брали 20 мл менструальной крови. В тот же день у донора 1 и здорового мужчины брали 20 мл периферической крови из кубитальной вены. Менструальную кровь центрифугировали при 300 g в течение 20 мин, затем собирали СМК. Периферическую кровь хранили 12 ч при 4 °C, после чего собирали сыворотку. Полученные сыворотки разводили до объемной доли 30 % в DMEM/F-12 и в течение 1 ч центрифугировали при 4000 g, затем пропускали через фильтр с размером пор 0.22 мкм. В полученных образцах измеряли содержание белка (метод с бидинхониновой кислотой) и разводили их до конечной концентрации 3.3 ± 0.1 мг/мл.

Цейтраферная съемка эмСК в автоматизированной системе Incucyte® ZOOM. Высеивали эмСК 7-го пассажа на шестилуночные планшеты в количестве 100 тыс. клеток на 1 лунку. На следующие сутки меняли среду культивирования на DMEM/F-12, содержащую ФБС, СПК или СМК. Помещали планшеты в систему IncuCyte® ZOOM Live Cell Analysis System (Essen Bioscience, США), представляющую собой автоматизированную систему прижизненного наблюдения за клеточными культурами (микроскоп с контроллером для обработки изображений), размещаемую внутри CO<sub>2</sub>-инкубатора. Цейтраферную съемку 16 полей зрения производили в каждой лунке в течение 4 сут с периодичностью 1 раз в час.

Анализ морфологии, времени удвоения популяции и скорости пролиферации эмСК. В полученных с помощью системы Incucyte® ZOOM изображениях визуально оценивали изменение морфологии клеток. Время удвоения ( $t_d$ ) популяции вычисляли по формуле  $t_d = (2 \cdot \Delta T \cdot X_0) / X$ , где  $\Delta T$  — время эксперимента,  $X_0$  — исходная площадь монослоя,  $X$  — площадь монослоя через время  $\Delta T$ . Скорость пролиферации определяли по тангенсу угла наклона прямой, полученной при помощи линейной регрессии кривой роста на временных промежутках от 0 до 10 и от 10 до 20 ч.

Иммуноцитохимия. В течение 5 сут эмСК 7-го пассажа культивировали на стеклах в DMEM/F-12 с 10 % ФБС. Затем клетки промывали теплой средой роста без сыворотки и фиксировали 1%-ным раствором формальдегида в течение 10 мин. После промывки PBS добавляли ледяной метанол. Через 5 мин постепенно отмывали от метанола PBS. Для выявления целевых белков стекла ин-

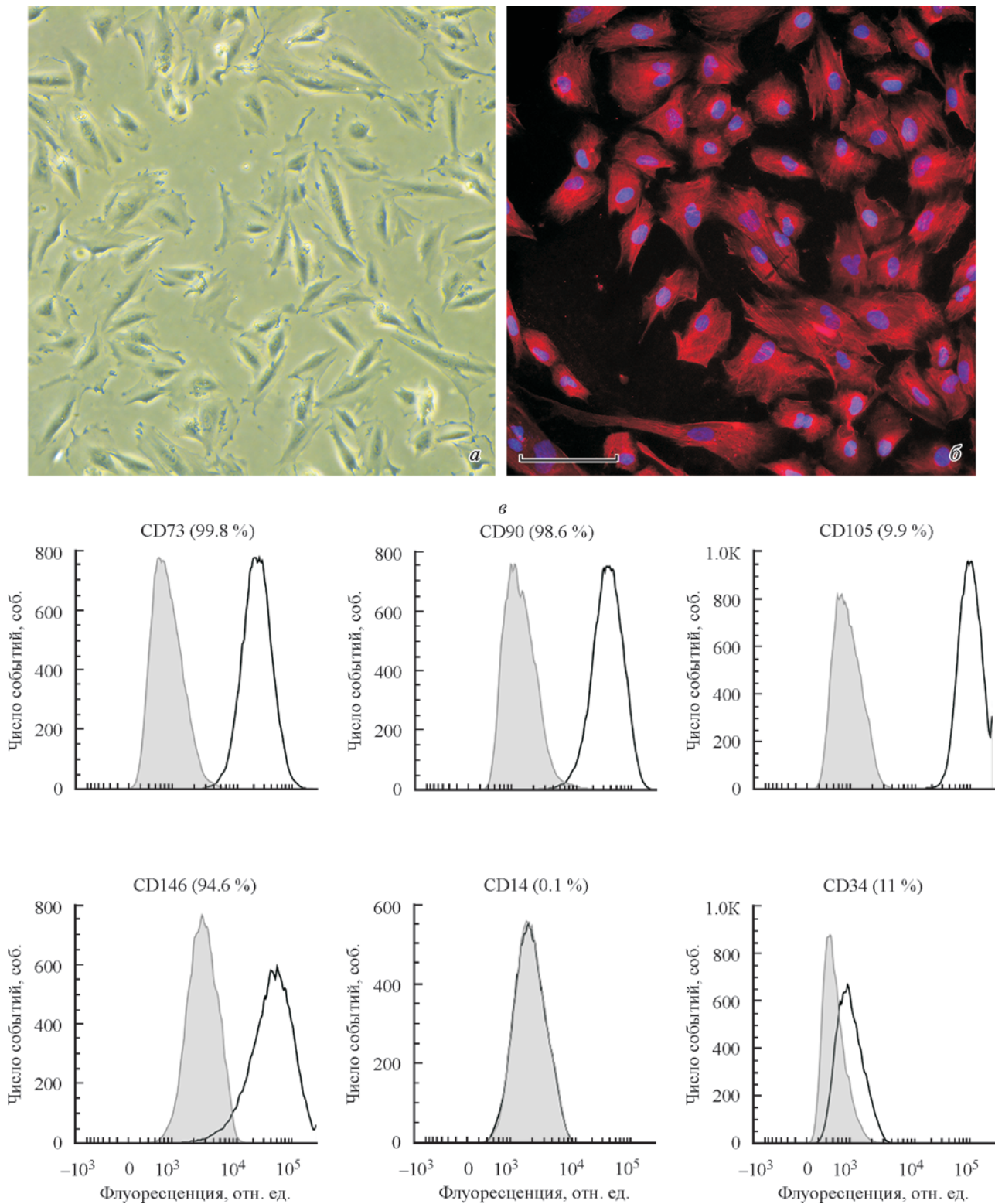


Рис. 1. Характеристика мезенхимных стромальных клеток эндометрия (ЭМСК).

*a* — ЭМСК с фибробластоподобной морфологией (прижизненная световая микроскопия, фазовый контраст); об. 20×. *б* — сеть виментиновых промежуточных филаментов (красный цвет) в ЭМСК, ядра помечены DAPI (синий); масштабный отрезок — 100 мкм. *в* — не менее 98 % ЭМСК несут поверхностные маркеры мезенхимных стромальных клеток (CD73<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>); 11 % ЭМСК несут CD34, 94.6 % — CD146.



кубировали в течение 24 ч при 4 °С с моноклональными мышинными антителами против гладкомышечного актина ( $\alpha$ -SMA) человека, виментина человека, кроличьими поликлональными антителами против VE-кадгерина человека. После отмывки PBS от первичных антител стекла инкубировали с соответствующими вторыми антителами, реактивными к IgG мыши или кролика. Ядра клеток метили флуоресцентным красителем DAPI. Анализировали препараты с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM6000B, снабженного камерой Leica DFC 360FX (Leica Microsystems GmbH, Германия).

Вестерн-блот-анализ. Для анализа уровня внутриклеточных белков использовали метод Вестерн-блоттинга. Лизаты клеток разделяли электрофоретически по Лэммли в полиакриламидном геле, после чего производили электроперенос белков на нитроцеллюлозные мембраны. Мембраны инкубировали с первичными антителами к гладкомышечному актину, VE-кадгерину или винкулину при температуре 4 °С в течение ночи. После этого мембраны отмывали и инкубировали 1 ч со вторыми антителами, реактивными к тотальным IgG мыши или кролика. Для визуализации специфического окрашивания использовали метод усиленной хемилюминесценции. Регистрацию сигнала проводили при помощи прибора ChemiDoc™ Touch (Bio-rad, США).

Статистическая обработка. Для получения статистически значимых результатов были сформированы две группы. В группу сравнения вошли все данные, полученные при культивировании ЭМСК с СМК ( $n = 4$ ), в группу контроля — все данные, полученные при культивировании ЭМСК с СПК ( $n = 4$ ). Статистическую обработку проводили с использованием программы STATISTICA 6.1. Для проверки статистической значимости различий данных между контрольной группой и группой сравнения использовали непараметрический критерий Манна—Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## Результаты

Характеристика ЭМСК. Выделенные клетки представляли собой клетки фибробластоподобной морфологии (рис. 1, а), способные проходить не менее

15 пассаживаний в культуре. Анализ кривых роста, полученных на приборе Incucyte® ZOOM, показал, что среднее время удвоения популяции при культивировании в присутствии 10 % ФБС составило  $39 \pm 4$  ч. При иммуноцитохимическом окрашивании в ЭМСК был выявлен виментин — компонент системы промежуточных филаментов, характерный для клеток мезенхимного происхождения (рис. 1, б). По данным проточной цитометрии, не менее 98 % ЭМСК 4—12-го пассажей обладали иммунофенотипом CD73<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>, характерным для мезенхимных стромальных клеток. Примерно 94.6 % ЭМСК были CD146<sup>+</sup>. При этом была выявлена популяция CD34<sup>+</sup>-клеток (около 11 %), в норме почти отсутствующих в культивируемых МСК жировой ткани или костного мозга (рис. 1, в).

В целом характеристика полученных нами ЭМСК соответствовала результатам других авторов, работающих с этими клетками (Meng et al., 2007; Мусина и др., 2008; Земелько и др., 2011).

СМК стимулирует пролиферацию ЭМСК. В течение 5 сут ЭМСК культивировали в присутствии СМК, СПК или ФБС. Анализ скорости роста ЭМСК в системе Incucyte® ZOOM показал, что клетки хорошо пролиферировали во всех испытанных сыворотках. При этом они не проявляли видимых признаков повреждения. Однако на кривых роста, отражающих пролиферацию ЭМСК под действием СМК, отсутствовала лаг-фаза, в то время как под действием СПК или ФБС она сохранялась (рис. 2, а). В первые 10 ч эксперимента и на отрезке от 10 до 20 ч скорость пролиферации в СМК была в 1.5 раза выше ( $p < 0.05$ ), чем в СПК (рис. 2, б).

СМК изменяет морфологию ЭМСК. Анализ изображений, полученных во время прижизненной цитраферной съемки ЭМСК, выявил устойчивые изменения морфологии клеток под влиянием СМК. При культивировании ЭМСК с ФБС или СПК клетки были более расплывчатыми, с хорошо выраженными кольцевыми или вытянутыми ламеллоподиями (рис. 3, д, е). В первые 20 ч культивирования в присутствии СМК клетки приобретали веретенообразную форму с вытянутыми заостренными концами и более ровными краями, ламеллоподии становились невыраженными (рис. 3, з). По достижении достаточной плотности и при образовании межклеточных контактов ЭМСК теряли веретенообразную форму, стано-

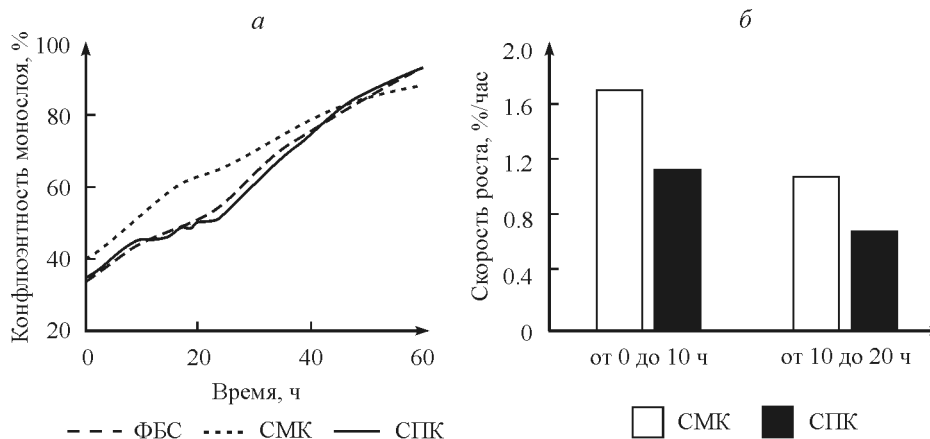


Рис. 2. Сыворотка менструальной крови стимулирует пролиферацию ЭМСК.

а — отсутствие лаг-фазы на кривой роста при культивировании ЭМСК с сывороткой менструальной крови (СМК) и ее наличие при культивировании с сывороткой периферической крови (СПК) или фетальной бычьей сывороткой (ФБС); б — при культивировании ЭМСК с СМК скорость увеличения площади монослоя (на временных интервалах 0—10 и 10—20 ч) была выше, чем при культивировании с добавлением СПК ( $p < 0.001$ ).

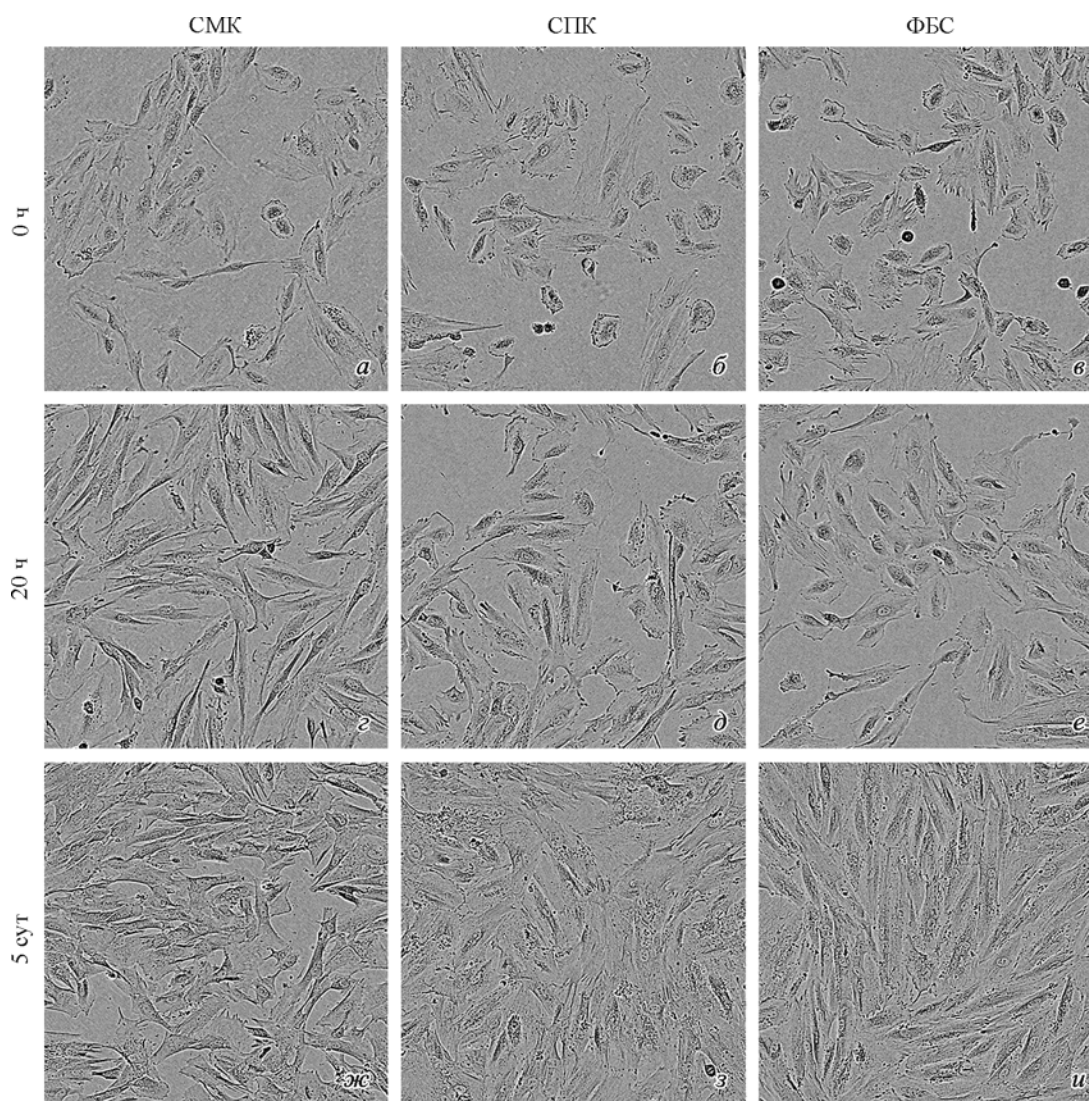


Рис. 3. Морфология ЭМСК при культивировании с разными сыворотками: СМК (а, г, ж), СПК (б, д, з) и ФБС (в, е, и) в течение 5 сут.

СМК изменяет морфологию ЭМСК. Об. 10×.

вась полигонально-звездчатыми (рис. 3, ж). При этом края оставались ровными, а значительная часть клеток уменьшилась в размере. Также следует отметить, что при культивировании с СМК значительно снижалась доля сильно распланных клеток с крупным округлым ядром и выраженными стресс-фибриллами.

СМК специфически снижает уровень  $\alpha$ -SMA в ЭМСК. Для выявления способности ЭМСК к дифференцировке в миофибробласты под влиянием сывороток анализировали уровень  $\alpha$ -SMA. По данным Вестерн-блоттинга, при культивировании ЭМСК с СПК уровень  $\alpha$ -SMA был статистически значимо выше, чем при культивировании с СМК (рис. 4, а). Иммуноцитохимический анализ показал, что при культивировании ЭМСК с ФБС  $\alpha$ -SMA локализовался в стресс-фибриллах (рис. 4, б).

СМК и СПК вызывают появление VE-кадгерина в ЭМСК. Для выявления способности ЭМСК к дифференцировке в эндотелиальном направлении под влиянием сывороток анализировали уровень VE-кадгерина. По данным Вестерн-блоттинга, при культивировании ЭМСК с СМК или СПК появлялся VE-кадгерин, в то

время как при культивировании с ФБС он практически отсутствовал (рис. 4, а). Иммуноцитохимический анализ не выявил VE-кадгерина в ЭМСК, культивированных в присутствии ФБС.

СМК и СПК не изменяют уровня E-кадгерина в ЭМСК. Для выявления способности ЭМСК к дифференцировке в эпителиальном направлении под влиянием СМК, СПК или ФБС анализировали уровень E-кадгерина. По данным Вестерн-блоттинга, уровень E-кадгерина в ЭМСК не зависел от используемого для культивирования типа сыворотки (рис. 4, а). Иммуноцитохимический анализ показал, что E-кадгерин локализовался в цитоплазме ЭМСК и отсутствовал в межклеточных контактах (рис. 4, в).

### Обсуждение

Заживление ран большинства органов человека происходит сходным образом. Повреждение вызывает кровотечение, которое завершается относительно быст-



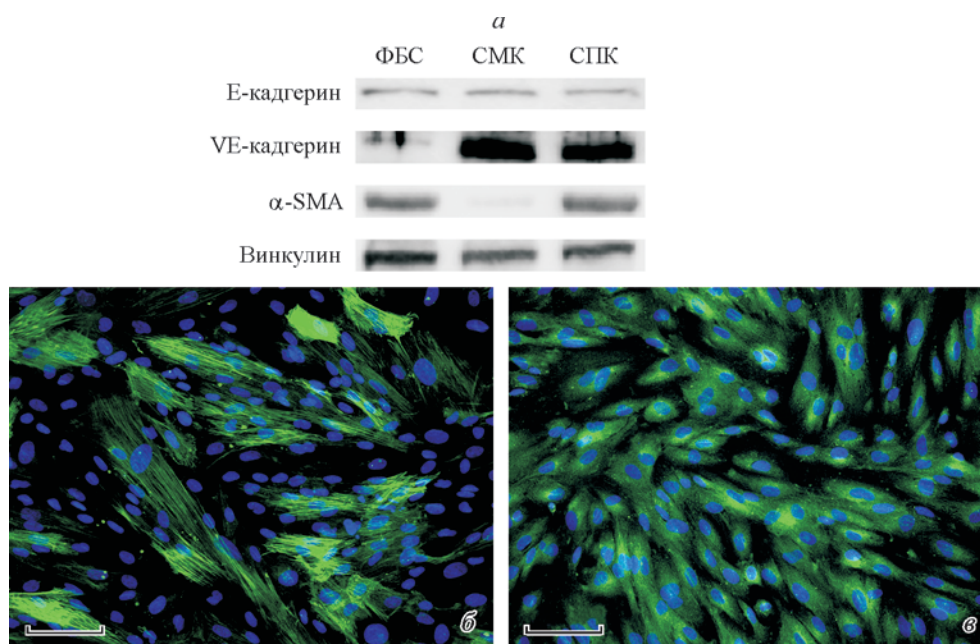


Рис. 4. Влияние сыворотки (СМК, СПК или ФБС) на уровень E-кадгерина, VE-кадгерина и  $\alpha$ -гладкомышечного актина ( $\alpha$ -SMA) в ЭМСК.

*а* — репрезентативные результаты Вестерн-блот-анализа, отражающие уровень E-кадгерина, VE-кадгерина и  $\alpha$ -SMA в ЭМСК при культивировании с СМК, СПК и ФБС. *б* — локализация  $\alpha$ -SMA (зеленый) в стресс-фибриллах ЭМСК при культивировании с ФБС, ядра помечены DAPI (синий). *в* — локализация E-кадгерина (зеленый) в цитоплазме ЭМСК при культивировании с ФБС, ядра помечены DAPI (синий); масштабные отрезки — 100 мкм.

рым гемостазом, после чего кровяной сверток закрывает раневую поверхность и восстанавливает целостность поврежденного органа. Замурованные между нитями фибрина форменные элементы крови выбрасывают в окружающее пространство большое количество биологически активных веществ, которые вместе с продуктами деградации поврежденных тканей активируют резидентные стромальные клетки (Stocum, 2012). Под действием окружения они мигрируют в зону повреждения и начинают дифференцироваться в миофибробласты, обеспечивая контракцию краев раны и синтез большого количества белков матрикса, который сначала становится основой грануляционной ткани, а затем главной составляющей рубца, остающегося в поврежденном органе до конца жизни (Talele et al., 2015).

Ранозаживление эндометрия во время менструации, напротив, не сопровождается образованием рубца или фиброзированием (Garry et al., 2009). Быстрое падение уровня прогестерона в крови вызывает спазм спиральных артерий и выброс резидентными стромальными клетками большого количества матричных металлопротеиназ (Maubin et al., 2015). Начинается отторжение функционального слоя эндометрия, сопровождаемое относительно слабым кровотечением. К моменту окончания менструации происходит полное восстановление нормальной структуры слизистой оболочки матки (Maubin et al., 2015). До этого момента из заживающей раны эндометрия постоянно выделяется менструальная кровь, которая представляет собой смесь, состоящую из кусочков отторгаемых тканей, межклеточной жидкости, форменных элементов и плазмы периферической крови (Garry et al., 2009). По этой причине мы посчитали возможным использовать жидкую часть менструальной крови для моделирования окружения ЭМСК, формируемого во время ранозаживления эндометрия.

В наших экспериментах ЭМСК в первые 20 ч культивирования в присутствии СМК приобретали веретеновидную форму с заостренными концами (рис. 3, *з*), которая, как правило, сопровождается направленное движение клеток (Григорьева и др., 2014). Миграция стромальных клеток в зону повреждения является неотъемлемой частью процесса ранозаживления в большинстве органов человека. Возможно, слизистая оболочка матки также не является исключением. Кроме того, показана возможность миграции МСК в эндометрий из костного мозга, однако роль этого феномена в ранозаживлении остается предметом дискуссий (Gargett et al., 2016).

СМК стимулировала пролиферацию ЭМСК во всех испытанных нами разведениях. Отсутствие лаг-фазы на кривой роста и ускорение пролиферации в первые 20 ч культивирования свидетельствуют о наличии в СМК растворимых факторов, не содержащихся в СПК и обладающих митогенным действием (рис. 2). Активная пролиферация клеток необходима на начальных этапах ранозаживления эндометрия, поскольку из их относительно небольшого числа должны заново сформироваться утраченные ткани (Garry et al., 2009).

Морфология, приобретаемая ЭМСК под действием СМК, указывает на перестройку актинового цитоскелета (рис. 3). Известно, что немышечные клетки, в том числе ЭМСК, несут две основные формы цитоплазматического актина —  $\beta$ - и  $\gamma$ -актин.  $\beta$ -актин встраивается в стресс-фибриллы, обеспечивая устойчивость клетки к механическим нагрузкам, в то время как  $\gamma$ -актин формирует кортикальную и ламеллярную сети, способствуя поддержанию формы и объема клетки (Lechuga et al., 2014). Обнаруженные нами значительное снижение количества стресс-фибрилл, слабая выраженность ламеллоподий и уменьшение размера ЭМСК под действием СМК могут свидетельствовать как о снижении общего количе-

ства актиновых микрофиламентов, так и об изменении их состава и распределения в цитоплазме. Подобные изменения морфологии МСК описаны в работах, посвященных поиску противомембранозных средств (Desai et al., 2014).

Культирование эмСК, а также МСК из других источников (Ngo et al., 2014) в присутствии ФБС вызывает в них появление  $\alpha$ -SMA, являющегося одним из основных маркеров миофибробластов (рис. 4, а, б). Вместе с  $\beta$ -актином он встраивается в стресс-фибриллы, обеспечивая еще большую устойчивость клеток к механическим нагрузкам и способность к контракции (Talele et al., 2015). По нашим данным, СКМ статистически значимо и специфически (по сравнению с СПК) снижает уровень  $\alpha$ -SMA в эмСК (рис. 4, а), что отражает противомембранозное действие СКМ. Судя по всему, отсутствие образования рубца или фибрирования при ранозаживлении эндометрия обусловлено не только собственными свойствами эмСК, но и микроокружением, формируемым во время менструации.

Одной из отличительных особенностей эмСК является наличие CD146 на поверхности большинства клеток популяции (Chen et al., 2016). Обнаружение нами Е-кадгерина в эмСК (рис. 4, в) коррелирует с результатами других авторов о возможности дифференцировки этих клеток в эпителиоциты (Fayazi et al., 2017), однако в наших экспериментах ни СКМ, ни СПК не стимулировали данный процесс (рис. 4, а). Возможно, он требует специфических контактных взаимодействий эмСК с белками межклеточного матрикса или другими типами клеток, что потребует дальнейшего изучения. В составе эмСК мы также обнаружили небольшую (около 13 %) популяцию эмСК, положительных на CD34, который относят к маркерам эндотелиальных предшественников (Sidney et al., 2014). Появление VE-кадгерина под действием СПК и СКМ может указывать на дифференцировку CD34-позитивных эмСК в эндотелиальном направлении (рис. 4, а). Вероятно, во время ранозаживления эндометрия эмСК также могут дифференцироваться в эндотелиоциты, участвуя в образовании капиллярной сети стромы.

В целом результаты нашей работы свидетельствуют о противомембранозных свойствах СКМ в сравнении с СПК. Кроме того, показана принципиальная возможность использования СКМ для моделирования ранозаживления эндометрия *in vitro*. Изучение механизмов этого процесса интересно с позиций как фундаментальной, так и прикладной науки. Подходы, существующие в регенеративной медицине в настоящий момент, опираются на тканевую инженерию и клеточную терапию. Эти подходы требуют сложных процедур культивирования клеток *ex vivo*, что создает риски для пациента с позиции безопасности лечения. Возможно, изучение механизмов ранозаживления слизистой оболочки матки позволит разработать методы индукции эпиморфной регенерации непосредственно в теле пациента.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 17-04-01452-А) с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы развития Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, а также с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках проекта Российского научного фонда (проект 14-50-00029).

## Список литературы

- Григорьева О. А., Коровина И. В., Гогия Б. С., Сысоева В. Ю. 2014. Изменение миграционных свойств мезенхимных стромальных клеток жировой ткани в условиях сокультивирования с активированными моноцитами *in vitro*. Цитология. 56 (4) : 251—259. (Grigoryeva O. A., Korovina I. V., Gogia B. S., Sysoeva V. Y. 2014. Migration properties of adipose-tissue-derived mesenchymal stromal cells cocultured with activated monocytes *in vitro*. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). 8 (5) : 359—367.)
- Земелько В. И., Гринчук Т. П., Домнина А. П., Арцыбашева И. В., Зенин В. В., Кирсанов А. А., Бичева Н. К., Корсаков 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., Artizbasheva I. V., Zenin V. V., Kirсанov A. A., Bichevaia N. K., Korsak V. S., Nikolsky N. N. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization and use as feeder layer for maintenance of human embryonic stem cell lines. Tsitologiya. 53 (12) : 919—929.)
- Мусина Р. А., Белявский А. В., Тарусова О. В., Соловьева Е. В., Сухих Г. Т. 2008. Мезенхимальные стволовые клетки эндометрия, полученные из менструальной крови. Клеточные технологии в биологии и медицине 2 : 110—114. (Musina R. A., Belyavski A. V., Tarusova O. V., Solovyova E. V., Sukhikh G. T. 2008. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. Bull. Exp. Biol. Med. 145(4) : 539—543.)
- Chen X., Kong X., Liu D., Gao P., Zhang Y., Li P., Liu M. 2016. *In vitro* differentiation of endometrial regenerative cells into smooth muscle cells: alpha potential approach for the management of pelvic organ prolapse. Int. J. Mol. Med. 38 : 95—104.
- Desai V. D., Hsia H. C., Schwarzbauer J. E. 2014. Reversible modulation of myofibroblast differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells. PLoS ONE. 9 : e86865. Doi: 10.1371/journal.pone.0086865
- Domnina A. P., Novikova P. V., Lyublinskaya O. G., Zenin V. V., Fridlyanskaya I. I., Mikhailov V. M., Nikolsky N. N. 2016. Mesenchymal stem cells with irreversibly arrested proliferation stimulate decidua development in rats. Exp. Therap. Med. 12 : 2447—2454.
- Fayazi M., Salehnia M., Ziaei S. 2017. *In vitro* construction of endometrial-like epithelium using cd146+ mesenchymal cells derived from human endometrium. Reprod. Biomed. Online. Doi: 10.1016/j.rbmo.2017.05.020.
- Gargett C. E., Schwab K. E., Deane J. A. 2016. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. Hum. Reprod. Update. 22 : 137—163.
- Garry R., Hart R., Karthigasu K. A., Burke C. 2009. A reappraisal of the morphological changes within the endometrium during menstruation: a hysteroscopic, histological and scanning electron microscopic study. Hum. Reprod. 24 : 1393—1401.
- Lechuga S., Baranwal S., Li C., Naydenov N. G., Kuemmerle J. F., Dugina V., Chaponnier C., Ivanov A. I. 2014. Loss of gamma-cytoplasmic actin triggers myofibroblast transition of human epithelial cells. Mol. Biol. Cell. 25 : 3133—3146.
- Maybin J. A., Critchley H. O. D. 2015. Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. Hum. Reprod. Update. 21 : 748—761.
- McCusker C. D., Gardiner D. M. 2013. Positional information is reprogrammed in blastema cells of the regenerating limb of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). PLoS ONE. 8(9). Doi: 10.1371/journal.pone.0077064.
- Meng X., Ichim T. E., Zhong 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—67.
- Ngo M. A., Muller A., Li Y., Neumann S., Tian G., Dixon I. M., Arora R. C., Freed D. H. 2014. Human mesenchymal stem cells ex-

press a myofibroblastic phenotype *in vitro*: comparison to human cardiac myofibroblasts. *Mol. Cell Biochem.* 392 : 187—204.

Patterson A. L., Zhang L., Arango N. A., Teixeira J., Pru J. K. 2013. Mesenchymal-to-epithelial transition contributes to endometrial regeneration following natural and artificial decidualization. *Stem Cells Develop.* 22 : 964—974.

Sidney L. E., Branch M. J., Dunphy S. E., Dua H. S., Hopkinson A. 2014. Concise review: evidence for cd34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells.* 32 : 1380—1389.

Stocum D. L. 2012. *Regenerative biology and medicine.* San Diego: Acad. Press. 474 p.

Talele N. P., Fradette J., Davies J. E., Kapus A., Hinz B. 2015. Expression of alpha-smooth muscle actin determines the fate of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Reports.* 4 : 1016—1030.

Поступила 17 X 2017

#### MENSTRUAL BLOOD SERUM SHOWS ANTIFIBROTIC EFFECT IN HUMAN ENDOMETRIAL MESENCHYMAL STROMAL CELLS

R. Yu. Eremichev,<sup>1,\*</sup> O. A. Makarevich,<sup>1</sup> N. A. Alexandrushkina,<sup>1</sup> K. Yu. Kulebyakin,<sup>1</sup>  
D. T. Dyikanov,<sup>2</sup> P. I. Makarevich<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Regenerative Medicine, and

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, M. V. Lomonosov Moscow State University; Moscow, 119192;

\* e-mail: romaneremichev@gmail.com

The endometrium of reproductive aged women has an ability for epimorphic regeneration which is unique in humans. Its key feature is wound healing stage, which ends up not in the scar formation, but results in complete restoration of normal structure of uterine mucosa. Involvement of endometrial mesenchymal stromal cells (eMSC) in wound healing can be due to characteristics of the environment formed during menstruation. Menstrual blood is secreted from the wound throughout the healing period, so we suggested to use its serum as a model object to reproduce effects of the soluble part of this environment on eMSC while peripheral blood serum (PBS) served as a control. We found that menstrual blood serum (MBS) influenced proliferation and morphology of eMSC and also specifically reduced level  $\alpha$ -smooth muscle actin of expression. Both MBS and PBS induced expression of VE-cadherin in eMSC, which was not observed under in eMSC treated by fetal bovine serum (FBS). Expression of E-cadherin was independent of the sera used. Obtained results may suggest antifibrotic effect of menstrual blood on eMSC regulating their potential involvement in regeneration of human endometrium.

Key words: endometrial mesenchymal stromal cells, menstrual blood, fibrosis.