

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ДОМНИНА

Алиса Павловна

**ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ПОЛУЧЕНИЕ,
ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ
РАЗВИТИЯ ЭНДОМЕТРИЯ КРЫС**

03.03.04. – Клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н., академик, Никольский Николай Николаевич

Санкт – Петербург

2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
2. ВВЕДЕНИЕ.....	5
• Актуальность проблемы	
• Цели и задачи исследования	
• Научная новизна работы	
• Теоретическое и практическое значение работы -	
• Апробация работы	
• Основные положения, выносимые на защиту	
3. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
• История изучения мезенхимных стволовых клеток человека	
• Основные характеристики ЭМСК	
• Применение ЭМСК для регенеративной медицины на экспериментальных моделях	
4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	29
• Получение и культивирование ЭМСК	
• Иммуноцитохимия	
• Адипогенная дифференцировка	
• Остеогенная дифференцировка	
• Изучение кинетики роста	
• Анализ активности SA- β -галактозидазы	
• Кариотипический анализ	
• Проточная цитофотометрия	
• Криоконсервация ЭМСК	
• Получение мононуклеаров костного мозга крысы	

• Подготовка клеток к трансплантации	
• Подготовка животных и проведение операции	
• Подготовка гистологических срезов и морфометрический анализ	
5. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	40
• Получение и характеристика эМСК	
• Трансплантация эМСК в матку псевдобеременным крысам	
• Трансплантация ККМ в матку псевдобеременным крысам	
6. ОБСУЖДЕНИЕ.....	61
7. ВЫВОДЫ.....	77
8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	78
9. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	80
10. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	82

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МСК – мезенхимные стволовые клетки

эМСК – эндометриальные стволовые клетки

ККМ – клетки костного мозга крысы

PBS – фосфатно-забуференный солевой раствор

БДК – большие децидуальные клетки

МДК – малые децидуальные клетки

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

ВВЕДЕНИЕ

1. Актуальность проблемы

В настоящее время в мире проводятся обширные исследования по разработке технологий использования мезенхимных стволовых клеток (МСК) для клеточной терапии различных заболеваний. Клетки со свойствами МСК выделены из различных тканей взрослого организма, включая подкожную и висцеральную жировую ткань, легкие, пульпу зуба, периодонтальную связку, ткань скелетных мышц, хрящей, сухожилий, синовиальную мембрану. Наиболее распространенными источниками для выделения МСК помимо костного мозга являются жировая ткань (Parker and Katz, 2006) и кровь пуповинного канатика (Bieback and Kluter, 2007). Но методы получения клеточного материала из костного мозга и жировой ткани являются болезненными и могут быть опасными для доноров, а кровь пуповинного канатика можно получить лишь раз в жизни. Поэтому возникла необходимость в поиске более доступного источника МСК. В последние годы появилось значительное число публикаций о выделении и использовании стволовых клеток эндометрия и менструальной крови (эМСК). Не инвазивный для донора способ получения, высокая пластичность, активная пролиферация и кариотипическая стабильность сделали данный тип МСК привлекательным объектом исследования с целью разработки способов их применения в клинике. Роль стволовых клеток в циклической регенерации эндометрия была несомненной уже много лет назад (Pranishnikov, 1978; Padykula et al., 1989; Padykula, 1991). Однако собственно популяция эндометриальных стволовых клеток была впервые изолирована из эндометрия, а затем и из менструальной крови человека, и охарактеризована лишь в 2004 г (Chen et al., 2004; Cho et al., 2004, Gargett, 2006). В течение последних лет биологические свойства эМСК

были охарактеризованы более полно, в том числе в отношении пластичности (Schwab et al., 2005; Gargett et al., 2006, 2009; Schwab and Gargett, 2007; Wolff et al., 2007; Morelli et al., 2012).

В литературе описаны положительные терапевтические результаты применения эМСК в экспериментальных исследованиях на животных при таких заболеваниях, как мышечная дистрофия Дюшена, инфаркта миокарда (Hida et al., 2008; Toyoda et al., 2007), инсульте (Borlongan et al., 2010), болезни Паркинсона (Wolff et al., 2011). Было показано, что трансплантированные эМСК тормозят рост глиомы у крыс (Han et al., 2009).

Учитывая эндометриальное происхождение данного типа МСК, показалось интересным и важным изучить их влияния на функциональное состояние эндометрия.

2. Цели и задачи исследования

Цель настоящей работы – выделение и характеристика мезенхимных стволовых клеток из десквамированного эндометрия, содержащегося в менструальной крови человека (эМСК) и изучение влияния трансплантации эМСК человека на развитие децидуальной оболочки у псевдобеременных крыс.

Задачи работы:

1. Выделение линий мезенхимных стволовых клеток из десквамированного эндометрия, содержащегося в менструальной крови человека (эМСК).
2. Характеристика полученных линий эМСК.
 - а) Изучение кинетики роста эМСК

- б) Иммунофлуоресцентный анализ маркеров эМСК.
 - в) Кариотипический анализ эМСК.
 - г) Изучение пластичности эМСК: остеогенная и адипогенная дифференцировка *in vitro*.
3. Исследование репликативного старения полученных эМСК.
 4. Разработка экспериментальной модели трансплантации МСК для оценки их влияния на развитие эндометрия у экспериментальных животных.
 5. Изучение влияния трансплантированных эМСК человека на развитие децидуальной ткани у псевдобеременных крыс.
 6. Изучение влияния трансплантированных видоспецифических клеток костного мозга (ККМ) крысы на развитие децидуальной ткани у псевдобеременных крыс. (В качестве контроля, для подтверждения стимулирующих свойств эМСК, а не их ксеногенного для крыс статуса.)

3. Научная новизна работы

Были получены и охарактеризованы 3 линии мезенхимных стволовых клеток из десквамированного эндометрия, содержащегося в менструальной крови человека (эМСК). Клетки этих линий обладают всеми свойствами, присущими мезенхимным стволовым клеткам: самообновлением, экспрессией специфических маркеров, мультипотентностью. Простой и не инвазивный для донора способ получения, активная пролиферация и мультипотентность делает эти клетки подходящим субстратом для клеточной терапии. Кроме того, данные клетки могут служить удобной моделью не трансформированных клеток человека для фундаментальных исследований в клеточной биологии и фармакологии.

Впервые был предложен и апробирован способ оценки влияния трансплантации эМСК на развитие эндометрия экспериментальных животных. Впервые была сделана попытка изучения терапевтических свойств эМСК *in vivo* на модели псевдобеременности у крыс. Было выявлено более интенсивное развитие децидуальной ткани после трансплантации эМСК в матку псевдобеременным крысам. При этом в результате трансплантации не изменяется гистологическая структура ткани. Впервые было обнаружено, что трансплантация эМСК ведет к увеличению размера децидуа за счет более интенсивного развития и пролиферации всех тканевых элементов. Для подтверждения стимулирующих свойств эМСК, а не их ксеногенного для крыс статуса, проводились эксперименты с использованием ККМ крысы в аналогичной модели. Было обнаружено, что трансплантация ККМ крысы оказывает такой же эффект, как и трансплантация эМСК человека.

Таким образом, полученные данные открывают дальнейшие перспективы для детального изучения влияния эМСК и других мезенхимных стволовых клеток на функциональное состояние эндометрия.

4. Теоретическое и практическое значение работы

В данной работе были отработаны методики выделения и культивирования МСК из альтернативного костному мозгу, более доступного тканевого источника – эндометрия, содержащегося в менструальной крови человека. Выделенные эМСК могут стать подходящим клеточным материалом при разработке подходов к лечению различных заболеваний и травм способами, основанными на принципах клеточной терапии. Полученные клетки могут служить объектом таких фундаментальных исследований в биологии, как исследования

механизмов пролиферации, дифференцировки и межклеточных взаимодействий. Кроме того, культуры эМСК как культуры не трансформированных клеток человека могут стать субстратом для фармакологии и вирусологии. Особенный источник выделения эМСК делает их подходящим модельным объектом для исследования свойств фармакологических препаратов, применяемых в акушерско-гинекологической практике.

Результаты работы могут быть использованы для дальнейшего изучения влияния эМСК и МСК из других тканевых источников на функциональное состояние эндометрия и разработки способов лечения форм бесплодия, связанного с недостаточным развитием эндометрия.

5. Апробация работы

Материалы работы были представлены на Конгрессе европейского биохимического общества «Механизмы в биологии» (Federation of European Biochemical Societies CONGRESS 2013 “Mechanisms in Biology”) (Санкт-Петербург, 2013), Всероссийском симпозиуме и Школе-конференции для молодых ученых по биологии клетки в культуре (Санкт-Петербург, 2013), Мировом конгрессе по регенеративной медицине (World Conference on Regenerative Medicine 2013) (Германия, Лейпциг 2013), I Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2013). По результатам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 4 статьи, и получен патент.

6. Основные положения, выносимые на защиту

1. Полученные линии эМСК полностью соответствуют статусу мультипотентных мезенхимных стромальных стволовых клеток человека, выделяемых из различных тканевых источников.

2. Длительное культивирование эМСК in vitro приводит к репликативному старению.
3. Трансплантация эМСК человека в матку псевдобеременным крысам стимулирует развитие децидуальной ткани у крыс.
4. Трансплантация видоспецифических ККМ крысы в матку псевдобеременным крысам стимулирует развитие децидуальной ткани у крыс в той же степени, что и трансплантация эМСК человека.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. История изучения мезенхимных стволовых клеток человека

В последние годы основным подходом для лечения многих тяжелых заболеваний является клеточная терапия, основанная на применении стволовых клеток. Стволовыми клетками называют соматические клетки многоклеточного организма, способными делиться (митозом) и дифференцироваться в разные специализированные клеточные типы. По происхождению стволовые клетки подразделяют на:

- эмбриональные, получаемые из внутренней клеточной массы бластоцисты на ранней стадии развития эмбриона;
- фетальные, выделяемые из плодного материала после аборта на сроке гестации 9-12 недель;
- стволовые клетки пуповинной крови;
- стволовые клетки тканей взрослого организма.

Кроме того, различают гемопоэтические стволовые клетки и мезенхимные стволовые клетки. Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) — это мультипотентные стволовые клетки, дающие начало всем клеткам крови миелоидного (моноциты, макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, эритроциты, мегакариоциты и тромбоциты, дендритные клетки) и лимфоидного рядов (Т-лимфоциты, В-лимфоциты и естественные киллеры). Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) — это мультипотентные стволовые клетки, способные дифференцироваться в клетки мезодермы: остеобласты (клетки костной ткани), хондроциты (хрящевые клетки) и адипоциты (жировые клетки) и других зародышевых листков.

Все стволовые клетки обладают двумя неотъемлемыми свойствами:

Самообновлением, то есть способностью сохранять неизменный фенотип после деления (без дифференцировки).

Потентностью (дифференцировочным потенциалом), или способностью дифференцироваться в виде специализированные типы клеток.

Термин «стволовая клетка» (нем. Stammzelle) был предложен к широкому использованию русским гистологом А. А Максимовым в 1908. Он описал гемопоэтические стволовые клетки и доказал их существование методами своего времени, именно для них был введён термин. А. А Максимов. во многом предопределил направление развития мировой науки в области клеточной биологии.

Несколько позже, в 1970 году профессор московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, А. Я. Фриденштейн изучал возможности этих особых клеток и подтвердил предположение коллеги. Оказалось, что клетки костного мозга, эксплантированные в культуру, жизнеспособны и могут длительно пролиферировать. Они обладали высокой эффективностью клонирования и способностью дифференцироваться в другие типы клеток мезодермы (Fridenshtein et al., 1968). Клетки, первоначально названные как образующие колонии фибробласты (CFU-F), позже получили название мезенхимных стромальных (стволовых) клеток (МСК). Позднее была показана способность МСК костного мозга дифференцироваться в кардиомиоциты, нейроны и астроциты (Pittenger et al., 1999; Jori et al., 2005).

В настоящее время установлено, что МСК костного мозга способны дифференцироваться не только в многочисленные типы клеток мезенхимального происхождения, включая клетки костной, хрящевой,

мышечной, сухожильной и жировой ткани, но также в клетки других зародышевых листков, включая глиальные клетки и нейроны (Woodbury et al., 2000), гепатоциты (Sato et al., 2005), клетки панкреатических островков (Choi et al., 2005). Кроме того, МСК костного мозга обладают высокой миграционной способностью, секретируют большое число биологически активных молекул и обладают иммуномодулирующим действием. Этими ключевыми свойствами МСК костного мозга и обусловлена возможность их эффективного применения в качестве источников стволовых клеток для лечения гематологических, аутоиммунных, сердечно-сосудистых заболеваний, травм и заболеваний костно-суставной системы (Wang et al., 2011; Bernardo et al., 2012).

Первые эксперименты по практическому использованию стволовых клеток были начаты ещё в начале 1950-х годов. Именно тогда было доказано, что с помощью трансплантации костного мозга (основного источника стволовых клеток) можно спасти животных, получивших смертельную дозу радиоактивного облучения. В 1968 г была доказана возможность восстановления кроветворения у реципиента после трансплантации костного мозга. Трансплантация костного мозга восьмилетнему мальчику приводила к исцелению от тяжёлой формы иммунодефицита. Донором стала сестра с совместимым набором лейкоцитарных антигенов (HLA) (Thomas, 1968).

Кроме костного мозга, МСК были выделены из жировой ткани (Parker, Katz, 2006), пуповинной крови (Harris et al., 2007), амниотической жидкости (De Coppi et al., 2007), а также из ткани эндометрия (Cho et al., 2004; Gargett, 2006). МСК обладают высокой пролиферативной активностью и способны дифференцироваться в разные ткани взрослого организма. Основное достоинство этих клеток состоит в возможности

использования для восстановительной трансплантации аутологичных клеток.

Гипотеза о присутствии МСК в эндометрии существовала давно (Pranishnikov, 1978; Padykula et al., 1989; Padykula, 1991). Эндометрий человека – это динамическая ткань, претерпевающая около 400 циклов регенерации, дифференцировки и отслаивания в течение репродуктивных лет жизни женщины. Каждый месяц 4—10 мм ткани нарастает в течение пролиферативной фазы менструального цикла (Gargett, Masuda, 2010). Эндометрий человека структурно и функционально разделяются на две основные части: базальный слой и функциональный слой. Функциональный слой содержит железы, окруженные рыхлой васкуляризованной стромой. Главная функция функционального слоя - обеспечение имплантации и поддержание беременности на самых ранних сроках. В конце каждого менструального цикла он разрушается и удаляется во время менструального кровотечения. Базальный слой состоит из плотной стромы и крупных сосудов и является генеративным компартментом для создания нового функционального слоя каждый месяц (Spencer et al., 2005), т.е. осуществляет регенерацию эндометрия. Правильно функционирующий эндометрий необходим для наступления и вынашивания беременности. Нарушение пролиферации эндометрия приводит к тяжелым гинекологическим заболеваниям, таким как эндометриоз, эндометриальная гиперплазия, эндометриальный рак. Повреждение эндометриального слоя приводит к образованию шрамов и развития синдрома Ашермана. Результатом этих нарушений является бесплодие или потеря беременности.

МСК из эндометрия можно получить разными способами: при гистероэктомии, диагностическом выскабливании, из децидуальной ткани первого триместра (Schüring *et al.*, 2011). Однако все эти процедуры являются инвазивными.

В последние годы обнаружили, что МСК присутствуют в менструальной крови (Meng *et al.*, 2007; Мусина и др., 2008; Patel *et al.*, 2008). Эти клетки так же рассматривают как эндометриальные стволовые клетки (эМСК), поскольку источником их происхождения является десквамированный эндометрий. Их свойства оказались сходными со свойствами мезенхимных стволовых клеток, ранее обнаруженных в других тканях. Основным преимуществом эМСК является доступность и нетравматичность получения исходного материала, что отличает их, например, от клеток костного мозга, источником которых является пункция костного мозга. эМСК выделяют из менструальной крови, помещая образец менструальной крови в культуральные флаконы в ростовую среду. эМСК, обладающие адгезивной способностью, прикрепляются к поверхности культуральных сосудов; другие клетки крови удаляются при смене среды.

Первые эксперименты с эМСК проводили на биопсийном материале эндометрия (Gargett, 2004, 2007). Оказалось, что эндометрий человека содержит небольшую популяцию эпителиальных (0.22%) и стромальных клеток (1.25%), которые вели себя как стволовые клетки *in vitro* (Gargett, 2004). Это свидетельствует о том, что в эндометрии человека присутствуют два разных типа стволовых клеток, которые отличаются по ростовым свойствам. Впоследствии на модельных животных было показано, что только стромальные стволовые клетки *in vivo* образовывали структуру, гистологически сходную

эндометриальными железами и стромой (Cervello et al., 2010), т.е., по-видимому, именно стромальные клетки участвуют в регенерации эндометрия в менструальном цикле.

Согласно базы данных MEDLINE более 250 публикаций посвящены стволовым клеткам эндометрия; из них более половины опубликовано в последние 6 лет. Около половины (45) публикаций согласно базе данных MEDLINE посвящено эМСК, выделяемых из менструальной крови. Среди них несколько обзоров, посвященных выделению, характеристике и применению этих клеток (Maruyama et al., 2010; Allickson et al., 2011; Lin et al., 2011).

2. Основные характеристики эМСК

Определение паттерна экспрессии специфических поверхностных молекул, обозначаемых как CD (cluster of differentiation) маркеры, является одной из наиболее важных характеристик стволовых клеток. Он определяется, главным образом, с помощью проточной цитофлуориметрии на живых клетках. Антитела к этим молекулам, как правило, меченные флуорохромом, коммерчески доступны.

К сожалению, в настоящее время нет маркеров специфичных для разных типов МСК. Международное общество по клеточной терапии определило минимальный критерий для мультипотентных МСК человека, а именно адгезивность, мультипотентность, экспрессию CD105, CD73 и CD90 и отсутствие экспрессии поверхностных маркеров гематопоетических клеток CD34, CD45, CD11a, CD19 и HLA-DR (Salem, Thiernemann, 2010).

В Таблице 1 приведены результаты исследования разных маркеров эМСК из менструальной крови (Meng et al., 2007). Видно, что эти клетки экспрессируют основные маркеры МСК (CD9, CD44, CD73, CD90,

CD105) и не экспрессируют основные маркеры кроветворных клеток (CD34, CD45). Однако, все же между ними и МСК есть и различия, например, они не экспрессируют STRO-1 маркер (маркер стромальных клеток).

Таблица1. CD-маркеры в выделенных линиях эМСК

CD	Название антигена	Уровень экспрессии
CD14	Маркер моноцитов	Негативный
CD34	Маркер гематопозитических стволовых клеток	Негативный
CD38	Маркер дифференцирующихся гематопозитических стволовых клеток	Негативный
CD45	Пан-лейкоцитарный маркер	Негативный
CD133	Гематопозитический/ангиобластный маркер	Негативный
STRO-1	МСК маркер	Негативный
SSEA-4	Маркер эмбриональных стволовых клеток	Негативный
Nanog	Маркер эмбриональных стволовых клеток	Негативный
CD9	МСК маркер, связанный с ангиогенезом	Позитивный
CD29	Адгезионная молекула мезенхимных и стволовых печеночных клеток	Позитивный
CD59	Ингибитор комплемента, найденный на МСК и SP-популяции CD34 стволовых клеток	Позитивный
CD73	Экто-5'-нуклеотидаза, связанная с миграцией МСК	Позитивный
CD41a	Рецептор фибриногена и vWF, найденный у МСК и тромбоцитах	Позитивный
CD44	Рецептор гиалуроновой кислоты, найденный у МСК	Позитивный

CD90	Маркер Т-клеток, МСК и гематопозитических клетках	Позитивный
CD105	МСК маркер	Позитивный
hTERT	Теломераза обратная транскриптаза	Позитивный
Oct-4	Маркер эмбриональных стволовых клеток	Негативный

Важной характеристикой МСК является их способность дифференцироваться в другие клеточные типы, имеющие мезодермальное происхождение. Наиболее распространенным тестом на мультипотентность МСК является проверка возможности их дифференцироваться в жировые клетки, хондроциты и остеобласты. Во всех работах, связанных с выделением и характеристикой эМСК, приводятся данные об их дифференцировки в эти клеточные типы под влиянием определенных условий культивирования (Allickson et al., 2011). Кроме того, эМСК могут дифференцироваться в кардиомициты (Hida et al., 2007)..Они дифференцируются не только в клетки, которые являются производными мезодермы, но и обладают способностью к трансдифференцировке в производные эктодермы - нервные клетки. (Borlongan et al., 2010).

Важным вопросом, возникающим при длительном культивировании нормальных клеток, является их генетическая стабильность, т.е. сохранение ими исходного диплоидного кариотипа. Спонтанная трансформация мезенхимных стволовых клеток грызуном является характерным событием (Miura et al., 2006; Li et al., 2007; Попов и др., 2010). Долгое время считалось, что нормальные клетки человека, введенные в культуру, в отличие от подобных клеток грызунов, не подвергаются спонтанной трансформации. Эти данные в основном были основаны на культивировании нормальных фибробластов кожи. Однако, в последние годы в связи с введением в культуру разных типов стволовых

клеток полученные данные относительно их трансформации (генетической стабильности). Есть данные о том, что при длительном культивировании мезенхимных клеток костного мозга сохранялся диплоидный кариотип и не наблюдалось никаких признаков спонтанной трансформации (Bernardo et al., 2007). Любопытные результаты опубликованы относительно спонтанной трансформации мезенхимных стволовых клеток человека (Garcia et al., 2010). Среди 25 независимых культур таких клеток авторы обнаружили одну с признаками спонтанной трансформации. Однако проведенное исследование показало, что эта линия на самом деле является постоянной трансформированной линией человека HT-1080, т.е. произошла контаминация, что является распространенным событием при одновременной работе с разными клеточными линиями (Drexler et al., 1999). Таким образом, данные, приведенные в работе (G.Røsland et al., 2009), согласно которым почти 50% культур мезенхимных клеток человека, полученным от разных доноров, проявили признаки онкогенной трансформации, причем некоторые из них на ранних пассажах, вызывают сомнения.

Ни в одной публикации о длительном культивировании эМСК человека нет указаний на их спонтанную трансформацию (Allickson, 2011). Это очень важно для возможного их применения в клеточной терапии, поскольку в этом случае требуется значительная биомасса клеток, которую нужно накапливать достаточно длительным культивированием. Безопасность эМСК проверялась при их трансплантации экспериментальным животным. Никаких признаков токсичности не отмечено (Allickson, 2011). Все это указывает на перспективность использования эМСК в заместительной терапии. Опубликованы первые исследования в этом направлении.

Таким образом, эндометриальные стволовые клетки человека, выделяемые из менструальной крови (эМСК), имеют следующие преимущества.

1. Процедура их получения в отличии от жировых клеток и клеток костного мозга, проста, безопасна и безболезненна для донора.

2. Возможна аутологическая трансплантация или трансплантация реципиентам с таким же HLA-субтипом, как и у донора. Кроме того, даже при трансплантации этих клеток реципиентам с другим HLA-субтипом, не наблюдаются резкие иммунологические реакции отторжения, т.е. эти клетки способны преодолевать иммунологический барьер.

Все это свидетельствует о широких перспективах применения эМСК в клеточной терапии, в том числе для лечения гинекологических нарушений.

3. Применение эМСК для регенеративной медицины на экспериментальных моделях

В первом из таких экспериментов проводилась успешная трансплантация эМСК человека (интактных и предифференцированных в миогенном направлении) в мышечную ткань мышей с дистрофией Дюшена (Cui et al., 2007).

В работе Хида с соавторами, выделенные эМСК человека были с высокой эффективностью дифференцированы *in vitro* в предшественники кардиомиоцитов, демонстрирующие характерный комплекс признаков, включая способность к спонтанному сокращению (Hida et al., 2008). Трансплантация эМСК в миокард крысы с моделированным инфарктом миокарда, продемонстрировала высокую эффективность дифференцировки клеток в кардиомиоциты *in vivo* в зоне инфаркта. При

этом авторы пришли к заключению, что слияние донорских клеток и клеток реципиента не имело места (Hida et al., 2008).

Положительный эффект эМСК показан на модели экспериментального инсульта *in vitro* and *in vivo*. Жизнеспособность нейронов крыс в условиях недостатка снабжения кислородом и глюкозой повышалась при совместном культивировании эМСК или в среде, кондиционированной эМСК. Трансплантация стволовых клеток из менструальной крови интрацеребрально или внутривенно крысам с экспериментально вызванным ишемическим инсульте улучшало поведение животных (Borlongan, et al., 2010). Крысам с глиомой, развивающейся в головном мозге, внутривенная или внутривенная инъекция эМСК человека из менструальной крови на 50% подавляла развитие опухоли (Han et al., 2009). Показано, что ингибирование обусловлено подавлением развития кровеносных сосудов, снабжающих опухоль. Эффект кажется парадоксальным, поскольку высокий ангиогенный потенциал эМСК, соответствующий их биологической роли в циклическом восстановлении чрезвычайно богатой кровеносными сосудами ткани эндометрия (Angle, 2008), послужил обоснованием для трансплантации эМСК менструальной крови мышам с моделированной критической ишемией конечностей, где был показан ангиостимулирующий эффект эМСК (Murphy et al., 2008). Дальнейшие исследования должны показать, существуют ли различия между физиологическим ангиогенезом и ангиогенезом при развитии опухоли.

Следует отметить, что опыты по трансплантации эМСК животным проводились без применения иммуносупрессантов. Это указывает на то, что эМСК являются иммунопривилегированными клетками, а некоторых ситуациях способны подавлять иммунный ответ. Опубликованы первые

исследования по применению эМСК в клинике. 4 пациентам с множественным склерозом внутривенно или интратекально вводили эМСК (Han et al., 2009). Больных наблюдали около года, и хотя заметных изменений в течении болезни не произошло, иммунологических реакций или побочных эффектов не наблюдалось. Клинический эксперимент подтвердил безопасность их применения, отсутствие эктопического роста и иммунных реакций. (Zhong et al., 2009).

Обнаружение в эндометрии человека стволовых клеток закрыло брешь в объяснении цитологических механизмов циклических изменений эндометрия в течение менструального цикла человека. Возможность выделения и получения эМСК открывает перспективы для их использования в клинической практике для лечения невынашивания беременности и бесплодия. По данным различных авторов суммарные перинатальные потери в различные сроки беременности в России колеблются от 15 до 45% беременностей (Татарова, 2002).

При беременности в клетках стромы эндометрия происходят специфические морфологические и биохимические изменения, обозначающиеся, как децидуальная реакция. Децидуализация эндометрия - это необходимый процесс для имплантации зародыша, формирования плаценты и дальнейшего успешного протекания беременности. Дифференцировка клеток эндометрия в децидуальные клетки у животных с гемохориальным типом плаценты является обязательным условием внутриутробного развития плода. Децидуальная оболочка человека и грызунов, в т.ч., крыс и мышей, включает в себя три основных типов клеток: большие децидуальные клетки (БДК) и малые децидуальные клетки (МДК) и гранулярные клетки эндометрия.

Строение децидуа крыс и мышей имеет региональные особенности, которые связаны с разделением децидуальной оболочки на мезометральную и антимезометральную области. Антимезометральная часть децидуа сформирована большими децидуальными клетками (БДК). Перед имплантацией отмечается пролиферация клеток-предшественников и появление БДК (Михайлов, 1998; Mikhailov, 2003). При имплантации бластоцисты проникают из полости матки через маточный эпителий в эндометрий антимезометральной части матки и продолжают дальнейшее развитие, в окружении БДК. Параллельно с ростом эмбрионального цилиндра увеличивается объем и толщина зоны БДК.

Мезометральная часть децидуа состоит из малых децидуальных клеток (МДК), между отростками которых распространяются гранулярные клетки эндометрия. Рост эктоплацентарного конуса эмбриона происходит в мезометральной части децидуа, в контакте с клетками которой формируется плацента. По представлениям Krehbiel (1937) БДК фундаментально отличаются от МДК. БДК крыс характеризуются крупными размерами и увеличенными объемами ядер за счет выраженной полиплоидии до 20 и более единиц ploидности. Встречаются двуядерные клетки. БДК образуют эпителиальную структуру, железу, с микроворсинками на апикальных частях клеток. Между собой БДК контактируют при участии щелевых и плотных контактов. При световой микроскопии БДК выглядят как наиболее крупные (30-40 мкм), округлые, овальные или полигональные клетки со светлыми цитоплазмой и ядром, образующие «черепицеобразные» пласты. Для них характерна высокая секреторная активность. Электронномикроскопически у БДК четко определены признаки экзоцитоза секреторных гранул по мерокриноному способу.

Для БДК человека не характерна выраженная полиплоидия. По общности ультраструктурной организации цитоплазмы и ядер, степени развития шероховатого ретикулума и аппарата Гольджи, наличию солитарных микроресничек, синтезу простагландинов, пролактина и пролактиноподобных белков, механизмам функционирования и зависимости дифференцировки от прогестерона БДК человека и крыс идентичны (Михайлов, 1998). Этот вывод позволяет переносить данные об особенностях дифференцировки клеток эндометрия и развития БДК крыс на развитие БДК человека.

Гранулярные клетки характеризуются небольшими размерами и зернистой цитоплазмой. Считается, что они выполняют иммуномодулирующую роль, предотвращая отторжение плода, и сдерживают инвазивные свойства трофобласта.

Клетки децидуальной ткани обеспечивают питание эмбриона и плода, секретирует пролактин, инсулиноподобный фактор роста и простагландины, что поддерживает беременность, контролируя инвазивную активность трофобласта и регулируя иммунологические отношения аллогенного плода и материнского организма. Децидуализация эндометрия развивается в результате воздействия бластоцисты на предварительно стимулированный эстрогенами и прогестероном эндометрий матки. На моделях псевдобеременных грызунов было показано, что децидуальная реакция может развиваться и в отсутствие бластоцисты после травматизации эндометрия. Псевдобеременность - это состояние, имеющее многие сходства с настоящей беременностью, такие как образование желтого тела, развитие молочных желез, изменение состава маточной слизи и предрасположенность эндометрия к децидуализации. Индукцию

псевдобеременности в эксперименте осуществляют электростимуляцией влагалища в стадии эструс или спариванием с вазктомированными самцами. Образовывающая в состоянии псевдобеременности «ложная» децидуа имеет одинаковое гистологическое строение с децидуа, развивающейся при нормальной беременности.

Недостаточная децидуализация эндометрия ведет к бесплодию при таких патологиях, как синдром Ашермана и атрофия эндометрия. По литературным данным частота встречаемости синдрома Ашермана, у женщин, проходящих гистероскопию составляет 1,55%. У женщин с повторными выкидышами частота встречаемости данной патологии составляет до 39% (Greenblatt, 1969).

Согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения «...около 8 % супружеских пар в течение репродуктивного периода жизни сталкиваются с проблемой бесплодия». Разработка и активное применение процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) в некоторых случаях не решает проблему невынашивания беременности.

Накопленные в течении ряда лет данные показали, что у млекопитающих с гемохориальным типом плаценты, полное развитие от имплантации бластоцисты до рождения жизнеспособного организма возможно только в матке. При пересадке рогов матки с плодами под кожу матери не происходило развития эмбрионов (Nicolas, 1947). При трансплантации плодного яйца вне матки развития тоже нарушалось. По данным Стивене, из 669 оплодотворенных яйцеклеток, пересаженных под белочную оболочку тестикул мышей, развились до стадии бластоцисты только 14.7% (Stevens, 1968). Кирби при пересадках оплодотворенных яйцеклеток под почечную капсулу наблюдал развитие до стадии бластоцисты в 32% (Kirby, 1960). Все авторы отмечают

дифференцировку трофэктодермы, торможение дифференцировки внутренней клеточной массы и общее отставание эмбрионов в развитии. В некоторых случаях трансплантированные бластоцисты превращались в тератокарциному (Stevens, 1968, Дыбан, 1988).

При проведении процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) оплодотворенную яйцеклетку культивируют в течении 2-4 дней до стадии бластоцисты (Edwards and Sharpe, 1971). Эмбрионы, взятые для культивирования со стадии дробящихся бластомеров, могут развиваться до эмбрионального цилиндра. При этом в некоторых из них происходит даже дифференцировка сомитов. Однако их развитие резко замедленно. В лучших экспериментах до органогенеза доживали 1-3% культивируемых эмбрионов (Hsu et al., 1974). Таким образом, культивирование зародышей *in vitro* не позволяет правильно управлять развитием.

Правильно функционирующий эндометрий необходим для наступления и вынашивания беременности. Нарушение пролиферации эндометрия приводит к тяжелым гинекологическим заболеваниям, таким как эндометриоз, эндометриальная гиперплазия, эндометриальный рак, эндометрит и является одной из главных причин бесплодия. Одним из подходов для выяснения механизмов нарушения функций эндометрия является моделирование их на экспериментальных животных. Исследования возможности применения ЭМСК, как средства заместительной терапии при нарушении функций эндометрия, на экспериментальных животных в литературе отсутствуют.

В представленной работе были выделены линии из десквамированного эндометрия менструальной крови человека, отвечающие всем критериям Международного общества клеточной

терапии по определению мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека.–Линии эМСК имеют позитивную экспрессию таких маркеров как CD73, CD90 и CD105, а также CD13, CD29, и CD44. Отсутствие экспрессии поверхностных маркеров CD19, CD34, CD45, CD117, CD130 и HLA-DR (класса II) характеризует клетки выделенных линий как имеющие мезенхимный стромальный, а не гемопоэтический фенотип. Мультипотентность выделенных эМСК подтверждена их способностью дифференцироваться в другие типы клеток мезодермы, такие как остеобласты и адипоциты (Zemelko et al.). Пролиферативная активность эМСК в культуре оценивается как высокая, время удвоения в среднем составляет 26-27 часов (Meng et al., 2007; Toyoda et al., 2007; Земелько и др., 2011), что соответствует их биологической роли. Полученные клетки имеют нормальный диплоидный кариотип. В совокупности с высокой доступностью эМСК, их ключевые свойства (высокая пролиферативная активность, стабильность генома, высокий уровень пластичности) делают эти клетки потенциально весьма ценным субстратом клеточной терапии многих заболеваний. После отработки технологии выделения, экспансии и направленной дифференцировки эМСК *in vitro*, эти клетки были использованы в трансплантационных экспериментах.

В данной работе изучалось влияние выделенных эМСК на процессы децидуализации эндометрия на модели псевдобеременности у крыс.

Результаты представленной работы показывают, что при введении в полость матки псевдобеременных суспензии эМСК человека децидуальная реакция развивается интенсивнее по сравнению с контрольным введением раствора PBS. Результаты взвешивания опытных и контрольных рогов в обеих группах показали, что по соотношению

масс развитие ткани в опытном роге превосходит контрольный в более чем 3 раза. При анализе гистологических срезов было обнаружено, что трансплантация эМСК в матку псевдобеременных крыс не нарушает дифференцировку децидуальных клеток и организацию децидуальной ткани, сохраняя в образовавшейся децидуе взаимное расположение участков дифференцированных клеток. Для подтверждения стимулирующих свойств эМСК, а не их ксеногенного для крыс статуса, проводились эксперименты с использованием аутологичных ККМ крысы в аналогичной модели. Полученные результаты показали, что трансплантация ККМ крысы оказывает такой же эффект, как и трансплантация эМСК человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

1. Получение и культивирование эМСК

Менструальную кровь, содержащую фрагменты эндометрия, получали от женщин, проходивших подготовку к ЭКО в Международном центре репродуктивной медицины (г. Санкт-Петербург). От всех доноров было получено письменное согласие на использование их биологического материала в научных целях. Возраст пациенток колебался в пределах от 30 до 40 лет. Во всех случаях менструальный цикл был регулярным и колебался от 27 до 30 дней. Забор менструальной крови проводили на 2-й день менструального цикла. Кровь собирали аспиратором Iras MVA plus с насадкой диаметром 4 мм, введенным в цервикальный канал до внутреннего зева. В среднем от каждой пациентки получали от 1 до 2-х мл менструальной крови. Полученный образец переносили в фосфатно-солевой буфер PBS (Sigma, США) с добавлением цитрата натрия и 10 % смеси антибиотика и антимикотика (смесь пенициллина, стрептомицина и амфотерицина) (Sigma, США). В этом растворе при температуре 4 °С менструальную кровь доставляли в лабораторию в течение 2–18 ч.

Центрифугированный осадок, содержащий фрагменты эндометрия, ресуспензировали в PBS с добавлением 10 % смеси антибиотика и антимикотика и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С. Затем отцентрифугированные эндометриально-менструальные клетки переносили в 6-см чашки Петри (Corning, США). Для получения адгезивной клеточной популяции клетки культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10 % бычьей эмбриональной сыворотки (FBS; HyClone, США), 1 % смеси антибиотика и антимикотика, 1 % глутамакса. Клетки культивировали в течение 3–7 сут. За это время среду меняли

несколько раз. Полученную адгезивную популяцию клеток (4–9 млн.) пересеивали с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и EDTA (Invitrogen, США) в соотношении 1 : 4 до 5-го пассажа 2 раза за 1 нед, далее в соотношении 1 : 3 и криоконсервировали. Для культивирования использовали флаконы T25 и T75 (Fisher Scientific, США). Плотность при пересеве составляла 14–15 тыс. кл/см².

2. Иммуноцитохимия

Для иммунофлуоресцентного анализа поверхностного антигена SSEA-4 живые клетки инкубировали с мышинными моноклональными антителами против SSEA-4 (Chemicon) в разведении 1 : 50 в течение 30–40 мин. Затем клетки фиксировали 15 мин 4%-ным раствором формальдегида (Sigma, США) на PBS. Несвязавшиеся антитела отмывали раствором PBS с добавлением 0.1%-ного Tween 20, и блокировали от неспецифического связывания 1%-ным раствором BSA (Sigma, США).

Флуоресцентное окрашивание антигенов Oct-4, нестина и бета-III-тубулина проводили согласно стандартному протоколу. Все клетки фиксировали 4%-ным раствором формалина, пермеабелизовывали 0.2–0.5% раствором Тритона X-100 (Merk, США). Для блокирования использовали 1%-ный раствор BSA на PBS в течение 30 мин. Использовали мышинные моноклональные антитела против Oct-4 (1 : 50) (Santa-Cruz, США) и бета-III-тубулина в разведении 1 : 1000 (Chemicon, США), а также кроличьи поликлональные против нестина (1 : 100) (Chemicon, США), и бета-III-тубулина (1 : 100) (Sigma, США). В качестве вторых антител использовали козы антимышинные антиглобулины от компании Jackson ImmunoResearch (США), Dylight 488 (1 : 400) или CY3 (1 : 300) (Chemicon, США). Для визуализации нестина использовали

антитела, конъюгированные с CY2 (1 : 300). Ядра подкрашивали раствором DAPI (Merk, США) в концентрации 1 мкг/мл. На готовые покровные стекла наносили 2%-ный раствор пропилгалата и анализировали с помощью микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия) и камеры Lieca DFC 420C (Германия).

3. Адипогенная дифференцировка

Клетки (2×10^4 кл/см²) высевали в чашки Петри, покрытые 0.1%-ным желатином (Sigma, США). После образования субмонослоя (80 % конфлюентности) в ростовую среду добавляли следующие факторы: 1 мМ дексаметазона (Sigma, США), 0.5 мМ изобутилметилксантина (IBMX; Sigma, США), 10 мкг/мл рекомбинантного инсулина человека (Sigma, США) и 100 мМ индометацина. Клетки культивировали в этой дифференцировочной среде в течение 5 сут со сменой половины среды каждые 2-е сут. Следующим этапом был перевод клеток на 1–2 сут в среду, поддерживающую их жизнеспособность, а именно: DMEM/F12, содержащей 10 % FBS, 1 % глутамакса, 1 % смеси пенициллина и стрептомицина и 10 мкг/мл инсулина. Таким образом, попеременно меняя среды культивирования, клетки дифференцировали 3–5 нед, а затем фиксировали 10%-ным формальдегидом в течение 1 ч. Жировые капли окрашивали красителем Oil Red (Sigma, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Контрольные клетки культивировали в ростовой среде без добавления стимулирующих факторов.

4. Остеогенная дифференцировка

Клетки (2×10^4 кл/см²) высевали в чашки Петри, покрытые 0.1%-ным желатином. После образования монослоя (100 % конфлюентности) в ростовую среду добавляли следующие дифференцировочные факторы: 100 нМ дексаметазона, 10 мМ бета-глицерофосфата, 0.2 мМ аскорбин-2-

фосфата. Клетки дифференцировали 3–5 нед со сменой половины объема среды каждые 2–3 сут. Затем клетки фиксировали 70%-ным ледяным этанолом 1 ч и окрашивали ализариновым красным (pH 4.1) (Sigma, США) в течение 30 мин. Контрольные клетки культивировали в ростовой среде без добавления стимулирующих факторов.

5. Изучение кинетики роста

Ростовые характеристики культуры определяли методом построения кривых роста. Для этого культуру ЭМСК сеяли в чаши Петри (3.5 см) в количестве 1×10^5 клеток на чашку. Ежедневно в течение 5 сут выполняли подсчет клеток с помощью камеры Горяева. Для каждой группы измерений использовали по 2 чашки, подсчет производили трижды и вычисляли среднее значение. Время удвоения популяции рассчитывали по формуле:

$$td = \frac{2 \cdot \Delta t \cdot x_0}{x},$$

где td - время удвоения популяции, x_0 - количество клеток в начале интервала времени, x - количество клеток в конце интервала времени, Δt - интервал времени. По полученным данным строили график кривой роста.

Для определения эффективности клонирования клетки сеяли с плотностью 5 и 10 кл/см² в 6-см чашки Петри. Эффективность клонирования определяли по соотношению числа клонов к числу посеянных клеток в процентах. Для визуализации клонов использовали краситель Гимза (BDH, Англия).

6. Анализ активности SA-β-галактозидазы

Проявление активности SA-β-галактозидазы (SA-β-gal) является широко распространенным маркером клеточного старения. Определение

активности этого фермента проводили с помощью Senescence SA- β -galactosidase staining kit (Cell Signaling, США) Для этого клетки высевали на 3.5-сантиметровые чашки Петри. На 2--3 сут культивирования ростовую среду удаляли, культуру отмывали раствором PBS. Далее клетки фиксировали смесью формальдегида и глутаральдегида при комнатной температуре в течение 10--15 мин. После фиксации культуру тщательно промывали раствором PBS. Затем добавляли окрашивающий раствор и инкубировали при 37 °С без CO₂ в течение 8 ч. При окрашивании величину pH поддерживали на уровне 6.0. Результаты оценивали с помощью светового микроскопа. Клетки, вступившие в стадию старения, обнаруживали по ярко синему окрашиванию цитоплазмы в результате активности SA- β -gal.

7. Кариотипический анализ

Препараты метафазных хромосом получали по схеме: накапливали клетки в стадии метафазы с использованием митостатика, обрабатывали их гипотоническим раствором, фиксировали и раскапывали суспензию на предметные стекла. В качестве митостатика использовали 0.05 мкг демиколцина (Sigma, США) на 1 мл среды. ЭМСК снимали 0.05%-ным раствором трипсина и EDTA. Гипотоническую обработку проводили 0.56%-ным раствором KCl. Клетки фиксировали стандартным способом в трех сменах свежеприготовленной смеси метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1). Фиксированный материал раскапывали на влажные охлажденные предметные стекла и высушивали при 37 °С. Хромосомы окрашивали на G-диски красителем Гимза в фосфатном буфере (pH 6.4) после предварительной обработки 0.25%-ным раствором трипсина по модифицированному методу Сибрайт (Seabright, 1977). Метафазные пластинки анализировали с помощью светового микроскопа

(Carl Zeiss, Германия) с использованием иммерсионного объектива 100×. Идентифицировали хромосомы в соответствии со стандартной номенклатурой (Yunis, 1980; Мамаева, 2002).

8. Проточная цитофотометрия

Иммунофенотипический анализ полученных эМСК на поверхностные CD-маркеры проводили с использованием проточного цитофлуометра Epics XL (Beckman Coulter, США). Единичную клеточную суспензию получали при помощи 0.05%-ного трипсина и EDTA. Клетки (1 млн/мл) ресуспензировали в растворе PBS, содержащем 5 % эмбриональной коровьей сыворотки. Для анализа использовали антитела, конъюгированные с FITC или фикоэритрином: CD13, CD29, CD34, CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-DR.

9. Криоконсервация эМСК

Для криоконсервации эМСК, открепленные с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и EDTA, помещали в пробирку с культуральной средой и центрифугировали со скоростью 1500 об/мин в течение 5 мин. Клетки ресуспензировали в бычьей эмбриональной сыворотке, содержащей 10 % DMSO, переносили в криовials и замораживали со скоростью 1°C/мин с последующим хранением в жидком азоте. При разморозке ампулу с клетками быстро нагревали в водяной бане при 37 °C, по каплям добавляли теплую ростовую среду, переносили в пробирку и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Отмытые от DMSO клетки сеяли во флаконы. эМСК культивировали на среде DMEM/F12, содержащей 10 % бычьей эмбриональной сыворотки, 1 % смеси антибиотика и антимикотика, 1 % глутамакса в пластиковых T25-флаконах. Их пересевали с помощью смеси трипсин-EDTA 2 раза в неделю в соотношении 1:3.

10. Получение моноклеаров костного мозга крысы

В качестве стволовых ККМ использовали моноклеарную фракцию ККМ (МККМ), выделенную из длинных костей конечностей крыс при помощи промывания костей раствором PBS. 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 растворе PBS. Клетки считали в камере Горяева.

11. Подготовка клеток к трансплантации

Культивирование клеток эндометрия для подготовки к трансплантации производилось на среде DMEM/F12, содержащей 10 % бычьей эмбриональной сыворотки, 1 % смеси антибиотика и антимикотика, 1 % глутамакса. На третий – четвертый день после посева, когда культура клеток достигала монослоя, производилось снятие клеток с подложки и переводение их в суспензию. Для открепления клеток применялась смесь трипсина и EDTA. Поскольку ферментативное действие трипсина может повредить мембраны клеток, что привело бы к снижению их жизнеспособности при трансплантации, применялся трипсин низкой концентрации (0.05%) и на возможно более короткий срок (в пределах 5 мин). Для быстрого действия трипсина после удаления ростовой среды монослой клеток несколько раз промывался раствором PBS. После открепления клеток действие трипсина инаktivировалось путем добавления к суспензии достаточного количества ростовой среды с 10% содержанием сыворотки. Для достижения гомогенности суспензия аккуратно пипетировалась. После приготовления одноклеточной суспензии производился подсчет клеток в камере Горяева. Далее культуральная среда заменялась раствором PBS.

Для этого суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 1500 об./мин, сливали супернатант и ресуспензировали осадок в растворе PBS, доводя количество клеток до нужной концентрации путем разведения. Все манипуляции, во избежание инфицирования животного, проводились с соблюдением стерильности.

В отдельных экспериментах по трансплантации эМСК проводился мониторинг клеток после введения их лабораторным животным. Для этого осуществлялась окраска культур эМСК прижизненными красителями. В основном применялись два красителя: Hoechst 33342, РКН 67, которые флуоресцируют на разных длинах волн, что дает возможность наиболее точно определить местонахождение клеток. Окраска Hoechst 33342 производилась в клеточном монослое на подложке. Для этого в ростовую среду добавляли краситель в разведении 1:1000. Инкубирование культуры клеток с красителем производили в CO₂ инкубаторе при температуре 37⁰С в течении 10 минут. Далее, после удаления ростовой среды, культуру клеток отмывали раствором PBS для полного удаления остатков красителя.

Окраска мембранным красителем РКН 67 (Sigma-Aldrich) производилась в суспензии. После приготовления клеточной суспензии проводилось центрифугирование в течение 5 мин при 1500 об./мин, для удаления остатков ростовой среды. Далее супернатант сливался и клетки ресуспензировались в растворе PBS. Затем проводилось повторное центрифугирование, после чего осадок ресуспензировался в специальном буферном растворе, входящим в состав набора для окраски. Сам краситель готовился отдельно, следуя инструкциям производителя. Затем оба раствора соединялись. Конечное содержание красителя в суспензии составляло 1×10^{-6} М в 1 мл. Инкубирование производилось при

комнатной температуре в течение нескольких минут. После экспозиции действие красителя приостанавливалось добавлением ростовой среды с сывороткой или просто сыворотки. Для сохранения жизнеспособности клеток остатки красителя и буфер удалялись центрифугированием с заменой на раствор PBS.

Чтобы проконтролировать качество окрашивания, часть суспензии помещали в чашки Петри с ростовой средой и культивировали. Результат анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

12. 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. Индукцию псевдобеременности осуществляли в фазе эструс. Отбор животных в стадии эструс выполняли методом микроскопии влагалищных мазков. Для индукции псевдобеременности проводили раздражение влагалища крысы электрическим током частотой 1 Гц, напряжением 10 мВ на протяжении 40 секунд. После проведенных манипуляций животному предоставляли покой. На пятый день, в стерильных условиях, под эфирным нарком животное фиксировали на операционном столе в дорсальном положении. Поле операции от последних ребер до крыльев подвздошных костей тщательно выбривали и дезинфицировали. Разрезы кожи и мышц брюшной стенки длиной 2 см производили с обеих сторон вдоль позвоночника, отступив от него по 1,5 см. Через разрезы извлекали правый и левый рога матки соответственно. В стенку правого рога матки трансплантировали суспензию стволовых клеток эндометрия (эМСК) человека (300 тыс. клеток в 10 мкл PBS). Контрольным рогом служил левый рог матки, в который таким же образом вводили раствор PBS.

После этого рану ушивали послойно и животному предоставляли покой. Через 6 дней крыса выводилась из опыта передозировкой эфирного наркоза и для морфологического исследования извлекали оба рога матки.

13. Подготовка гистологических срезов и морфометрический анализ

Утолщения рогов матки сравнивали друг с другом, вырезали из матки вместе с мышечной оболочкой и остатками рогов матки. Срезы сформировавшихся децидуа толщиной 15 мкм готовили на криостате. При этом децидуа ориентировали так, чтобы срез проходил параллельно мезометрально-антимезометральной оси матки. Строгая ориентация плоскостей срезов децидуа позволяет иметь репрезентативные срезы для изучения региональной дифференцировки клеток децидуа. Кроме того, при подобной ориентации резки плоскости срезов децидуа имеют максимальные размеры, что позволяет делать количественное сравнение соседних децидуа. На таких срезах децидуа имеет форму овала, слегка вытянутую в мезометральном-антимезометральном направлении.

Срезы фиксировали в смеси этанола с метанолом при -20°C в течение 2 мин и окрашивали гематоксилином и эозином. При микроскопическом изучении оценивали целостность децидуа и отсутствие очагов воспаления или некроза, а также степень дифференцировки децидуа 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 децидуа, которая образована большими децидуальными клетками (БДК), и вычисляли долю длины этой части децидуа.

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

Было получено 3 клеточные линии из менструальной крови (эМСК), которые были охарактеризованы. Исходным материалом для линий явилась менструальная кровь женщин 24 - 38 лет, проходивших процедуру экстрапорального оплодотворения. От всех доноров было получено письменное согласие на использование их биологического материала в научных целях. Исследованные линии эМСК морфологически, по экспрессии маркеров, пролиферативной активности и дифференцировочному потенциалу были схожи.

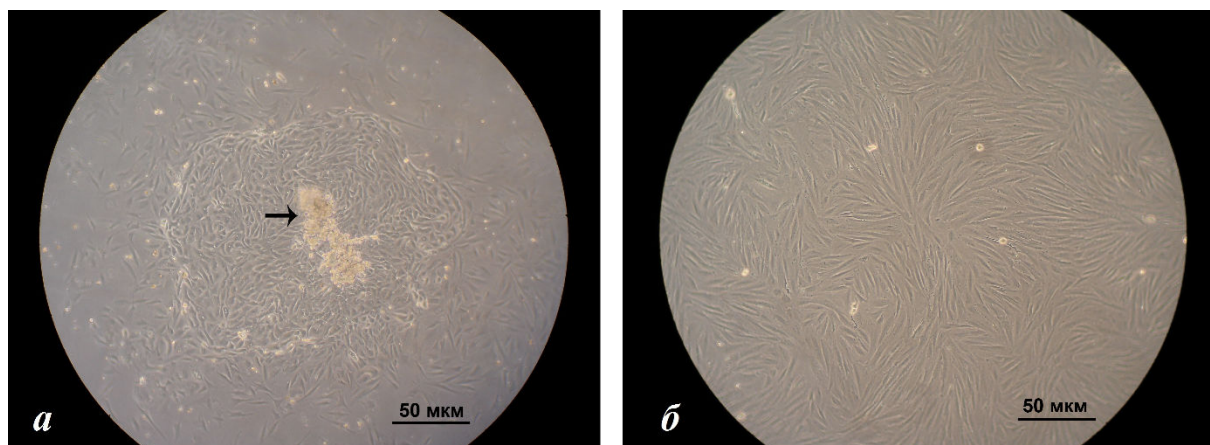


Рисунок 1. Выделение эМСК.

а – выселение эМСК из фрагмента эндометрия, б – монослой, характеризующий морфологию эМСК в процессе культивирования, стрелкой указан кусочек эндометриальной ткани вокруг которого эМСК образуют колонию. Фазовый контраст. Об. 10 ×.

Одним из признаков мезенхимных стволовых клеток является их адгезивность к пластику. При переносе образца менструальной крови в культуральный сосуд в ростовую среду, отдельные клетки или их скопления прикрепляются к поверхности культурального сосуда и начинают пролиферировать. На Рисунке 1, а, стрелкой указан участок

эндометриальной ткани, вокруг которого образуется колония эМСК. Считается, что источником эМСК являются кусочки базального слоя эндометрия, который отслаивается в процессе менструального цикла. Образцы культур менструальной крови, в которых наблюдался наибольшее количество адгезивных клеток отбирались для дальнейшего культивирования и получения линий.

Полученные клетки характеризуются фибробластоподобной морфологией. Они активно пролиферируют *in vitro* и образуют монослой. На Рисунке 1, б представлена культура эМСК после 3–7 сут культивирования. Видны круглые митотические клетки и фибробластоподобные эМСК, образующие характерные круговые завихрения.

На ранних пассажах (пассаж 1-3) заметно, что выделенные эМСК – это гетерогенная популяция клеток, состоящая из фибробластоподобных и эпителиальных клеток, но при дальнейшем культивировании селективным преимуществом обладают фибробластоподобные (стромальные) клетки.

На Рисунке 2 представлено два типа клеток в культуре эМСК пассажа 1. Слева хорошо видны эМСК с фибробластоподобной морфологией. На их фоне, справа, выделяются более мелкие, округлые клетки (указаны стрелкой). Это популяция эпителиальных клеток, сохраняющаяся при культивировании эМСК в небольшом количестве (Gargett, 2004, 2007).

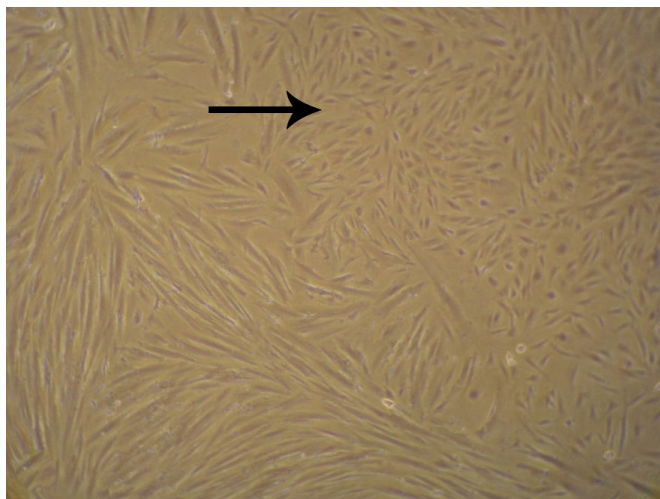


Рисунок 2. эМСК человека в культуре, пассаж 1

Стрелкой указаны эпителиоподобные клетки. Об. 40×

Экспрессия определенных маркеров является обязательным свойством МСК, выделяемых из любых тканевых источников. Результаты проточной цитофлуометрии показали, что выделенные эМСК экспрессируют такие поверхностные маркеры как CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, не экспрессируют гемопоэтические маркеры CD 34 и CD45, CD19, CD130 и HLA-DR (класса II) и слабо экспрессируют CD117 (c-kit). Все это соответствует как базовым, так и дополнительным критериям Международного общества клеточной терапии для фенотипирования МСК человека по экспрессии поверхностных маркеров (Husein, Thiernemann, 2010).

Гистограммы Рисунка 3 иллюстрирует данные проточной цитофлуометрии. Можно обратить внимание, в что полученные эМСК наблюдается высокий уровень экспрессии основных поверхностных антигенов МСК. Процентное соотношение клеток в популяции, экспрессирующих CD90 составляет 95.2 %, CD105 – 98,2%, CD73- 99,7%, CD44 – 99.6%. Количество клеток, имеющих гемопоэтические маркеры CD 34 и CD45, CD19, CD130 и HLA-DR (класса II) составляет менее 4 %.

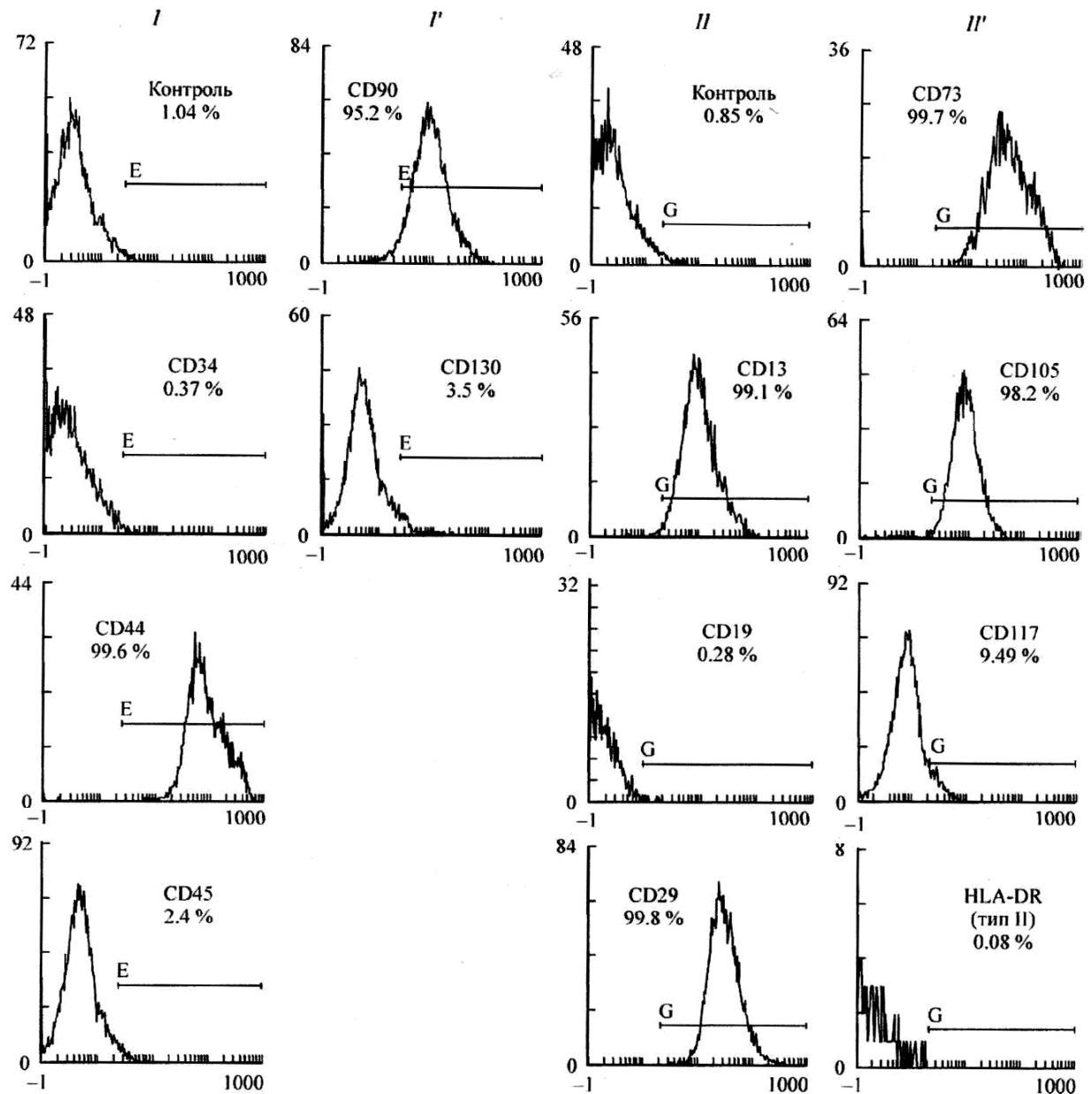


Рисунок 3. Уровень экспрессии поверхностных маркеров эМСК.

Проточная цитофлуометрия. Ряды I, I' – клетки окрашены FITC, ряды II, II' – клетки окрашены фикоэритрином.

Иммунофлуоресцентный анализ полученных линий эМСК показал частичную (более 50 %) экспрессию маркера плюрипотентности SSEA-4, 100%-я экспрессия которого характерна для эмбриональных стволовых клеток человека. Некоторые авторы указывают, что эМСК экспрессируют маркеры плюрипотентности (Oct4, Nanog, SSEA-4).

Однако, у выделенных эМСК экспрессия маркера плюрипотентности Oct-4 не была выявлена ни иммунофлюоресценцией, ни ПЦР.

На Рисунке 4 представлены результаты иммунофлуоресцентного анализа полученных линий эМСК на экспрессию маркера плюрипотентности SSEA-4. Положительная экспрессия определяется на мембране эМСК, в местах фокальных контактов (зеленая флуоресценция). Ядра (синего цвета) контрокрашены DAPI. Экспрессия поверхностного антигена SSEA-4, обычно определяющая плюрипотентный статус эмбриональных стволовых клеток, является характерной не только для эМСК (Patel et al., 2008), но и для МСК костного мозга (Gang et al., 2007).

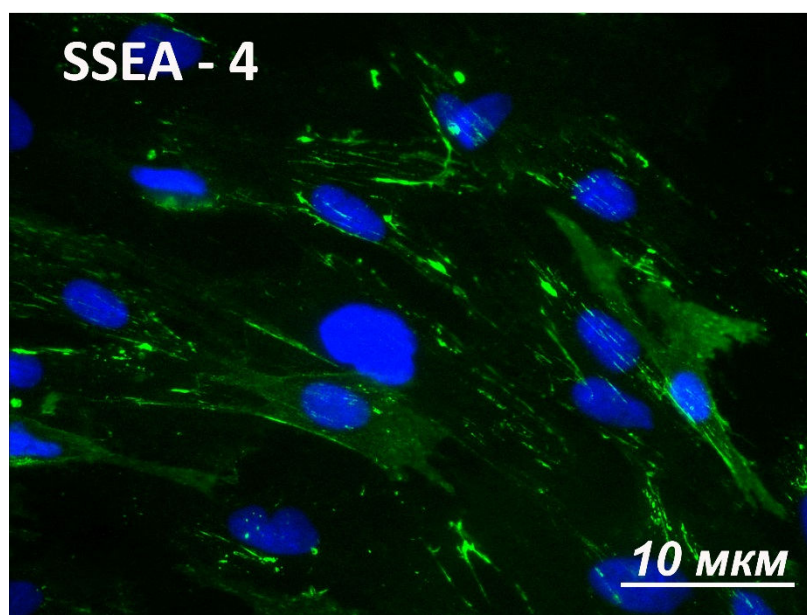


Рисунок 4. Экспрессия SSEA-4 в эМСК.

Ядра окрашены DAPI.

Обязательным свойством стволовых клеток является их мультипотентность. Согласно критериям Международного общества клеточной терапии, мультипотентность любых МСК человека определяется их способностью под воздействием определенных стимулов дифференцироваться *in vitro* в другие типы клеток мезодермы.

На Рисунке 5 показана дифференцировка эМСК в адипоциты (Рисунок 5, а, б) и остеобласты (Рисунок 5, в, г). Обе культуры обладают специфическими гистологическими характеристиками. Так, для адипоцитов характерно накопление жировых вакуолей, а для остеобластов – наличие кальциевых отложений. Окрашенные Oil Red жировые капли располагаются в цитоплазме полученных адипоцитов в перинуклеарном пространстве (Рисунок 5, б). Это гистологически отличает адипоциты, дифференцированные из эМСК менструальной крови, от адипоцитов, полученных из МСК жировой ткани и костного мозга, где жировые вакуоли распределены по цитоплазме равномерно (Musina et al., 2006). Эффективность адипогенной и остеогенной дифференцировки составляли в наших экспериментах 70–80 % и 30 % соответственно.

Полученные эМСК экспрессируют нестин (Рисунок 6, а) и бета-III-тубулин, (Рисунок 6, б), что свидетельствует об их предрасположенности к дифференцировке в нейрональные клетки. Литературные данные о присутствии нестина в недифференцированных мезенхимных стволовых клетках противоречивы. Одни авторы не находят этого белка в таких клетках (Shakhbazov et al., 2009), другие авторы предполагают, что экспрессия нестина характерна для мультипотентных прогениторных клеток (Wiese et al., 2004). Данные о присутствии бета-3-тубулина в недифференцированных мезенхимных стволовых клетках отсутствуют.

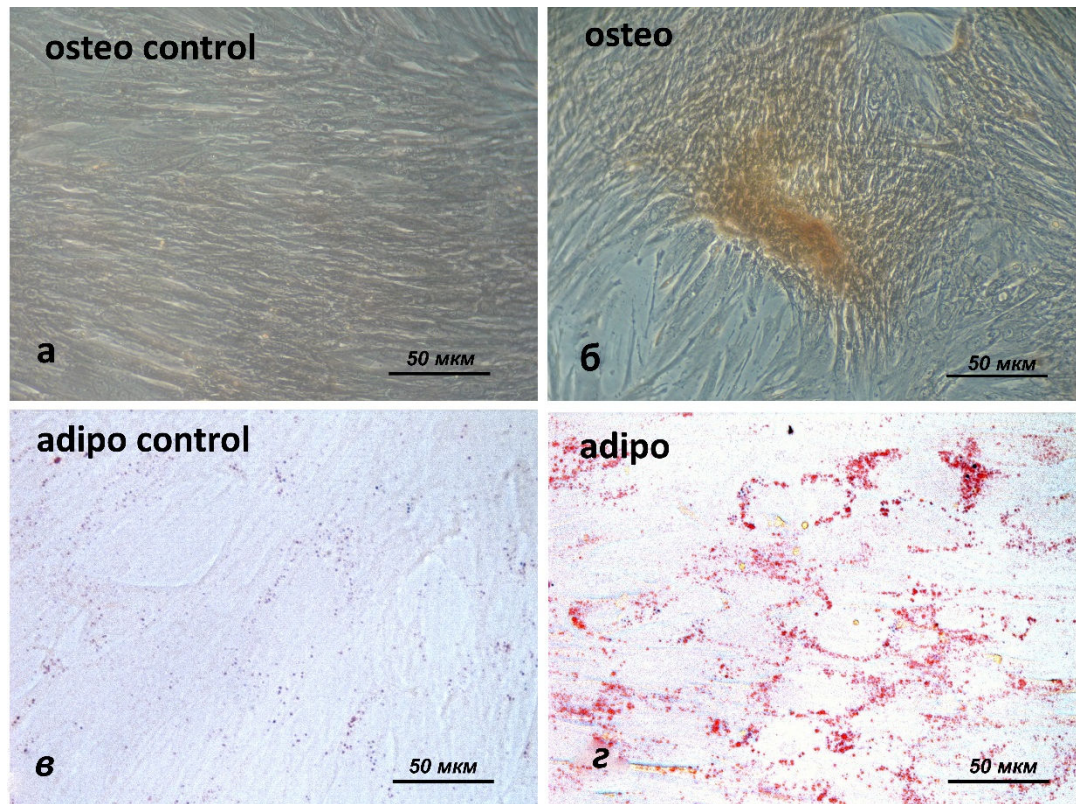


Рисунок 5. Направленная дифференцировка эМСК в другие клетки мезодермы.

а – контрольные недифференцированные клетки; *б* – остеобласты, отложения кальция окрашены красителем ализариновым красным; *в* – контрольные недифференцированные клетки, *г* – адипоциты, жировые вакуоли окрашены красителем Oil Red. Об. 40× (*а–б*) и 20× (*в–г*)

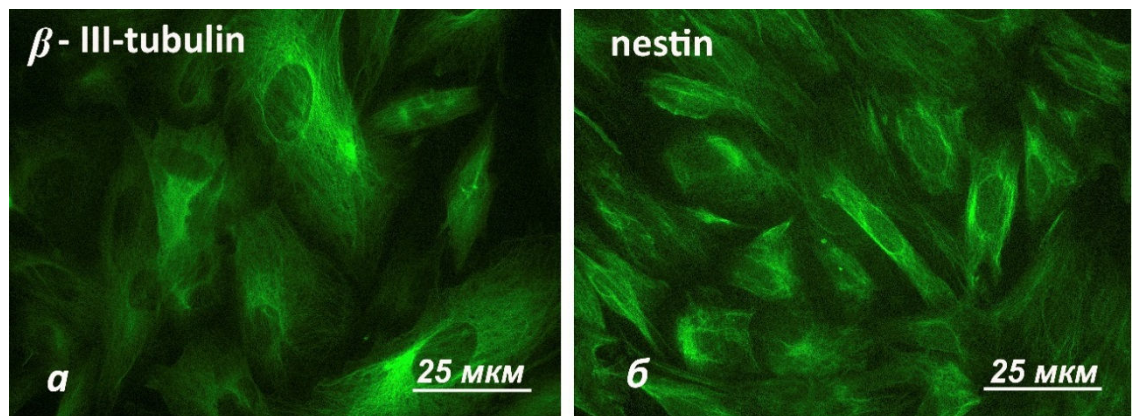


Рисунок 6. Экспрессия фенотипических маркеров эМСК.

а – бета-III- тубулин, *б* – нестин

Кариотипирование клеток линий эМСК с применением дифференциальной окраски хромосом на G-диски на ранних этапах культивирования (пассажи 3, 6) и более поздних (пассажи 15, 22) показало, что большинство проанализированных клеток имели структуру кариотипа, типичную для клеток человека в норме. На этом фоне с низкой частотой встречались клетки с отклонениями как в числе хромосом, так и в структуре кариотипа (появлялись анеуплоидные, околотетраплоидные клеточные варианты). Цитогенетические изменения были нескольких типов – эктопическая конъюгация между хромосомами, появление изохромосом, лишних хромосомных копий, поломок хромосомного материала (Рисонок 7). Выявленные в пределах каждой проанализированной клеточной популяции кариотипические изменения не были закономерными, не получали пролиферативного преимущества в процессе культивирования клеток.

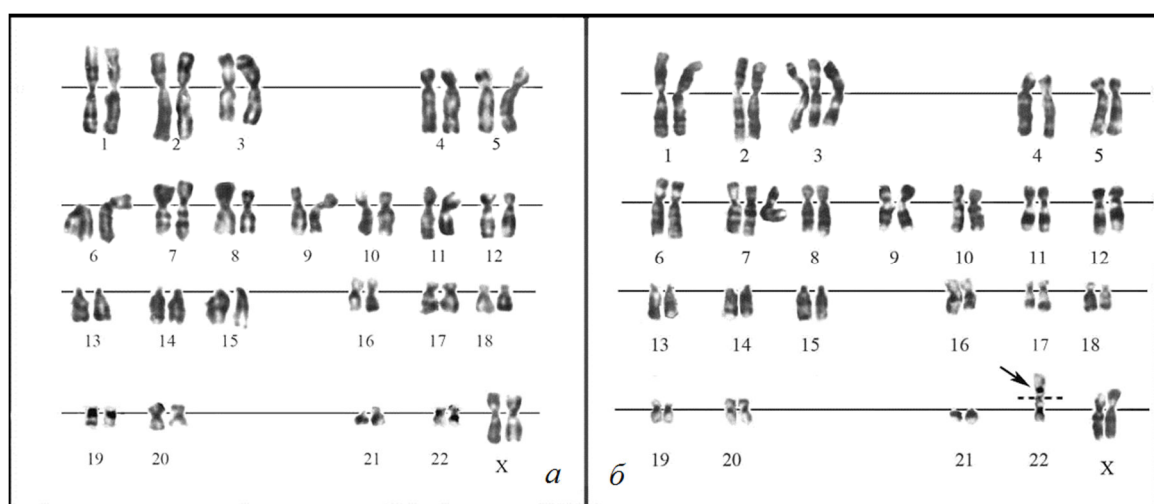


Рисунок 7. Кариотип эМСК пассаж 3.

а -- кариотип клетки эМСК с нормальным набором хромосом, $2n = 46$, XX;

б -- кариотип эМСК с трисомией хромосом 3 и 7 и эктопической конъюгацией гомологов хромосомы 22. Стрелкой указана изохромосома 22.

Проллиферативные характеристики выделенных эМСК оценивались по времени удвоения популяции, эффективности клонирования и по кривой роста. В Таблице 2 приведены данные по характеристике времени удвоения популяции и эффективности клонирования клеток полученных линий. Видно, что время удвоения популяции в разных линиях варьировало в близких пределах от 26.7 до 27.4 ч, т.е. популяция удваивалась примерно через 1 сут культивирования. Эти данные свидетельствуют об активном делении клеток. Для сравнения время удвоения клеток костного мозга даже на ранних пассажах составляет около 60 ч (Røsland et al., 2009).

Таблица 2. Время удвоения популяции и эффективность клонирования эМСК разных линий.

Линия эМСК	Время удвоения, часы	Эффективность клонирования, %
1	27.4	66
2	27.2	62
3	26.7	60

В процессе культивирования клетки от момента перевода их *in vitro* до старения, проходят более 45 удвоений популяции. Согласно литературным данным число удвоений для эМСК колеблется от 25–30 (Hida et al., 2008) до 68 в отдельных случаях (Meng et al., 2007). Размороженные после криоконсервации эМСК обладают высокой пролиферативной активностью, сохраняют свою морфологию и характерную фенотипическую экспрессию CD-маркеров.

Высокая эффективность клонирования эМСК (около 60 %) также свидетельствует о высоком пролиферативном потенциале данных клеток. Однако по мере культивирования пролиферативная активность клеток постепенно снижается.

Анализ кривых роста эМСК на разных пассажах показал, что на 13-м пассаже клетки достигают стационарной фазы (остановки деления) позднее, чем на 5-м пассаже. Количество клеток на стадии плато (стационарной фазы) в культурах более поздних пассажей также уменьшается (Рисунок 9).

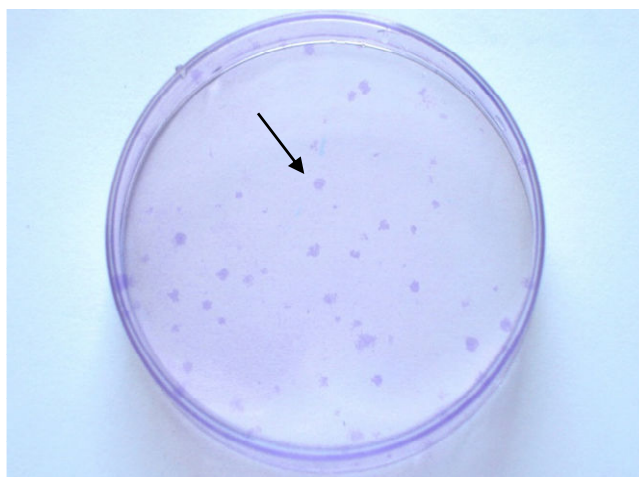


Рисунок 8. Определение эффективности клонирования эМСК.

Стрелкой указан клон эМСК. Краситель Гимза.

По мере культивирования морфология клеток изменяется. Исходные клетки имеют фибробластоподобную форму и образуют после посева и культивирования монослой. На поздних пассажах (пассаж 26 - 30) клетки увеличиваются в размере, уплощаются и не образуют плотного монослоя. Эти признаки характерны для клеточного старения. Для идентификации клеточного старения широко используется окраска на ассоциированную со старением SA- β -gal. Этот фермент является лизосомальной гидролазой и активен в норме при pH 4.0. Идентификация стареющих клеток основана на том, что в них этот фермент проявляет

свою активность при pH 6.0. По мере культивирования число SA- β -gal-позитивных клеток увеличивается (Рисунок 10) и, в конце концов, достигает практически 100 %. В общей сложности все полученные нами линии прошли около 40—45 удвоений клеточной популяции, после чего клетки необратимо утратили способность делиться и постепенно погибли.

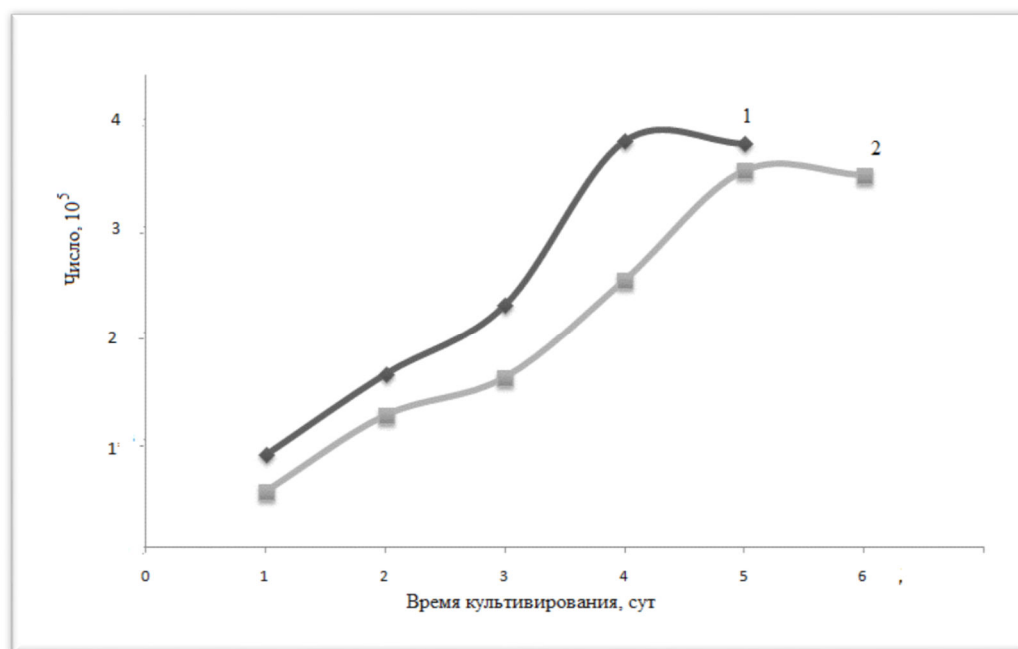


Рисунок 9. Кривая роста мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека (ЭМСК) на разных пассажах.

Кривая 1 - пассаж 5, кривая II - пассаж 13.

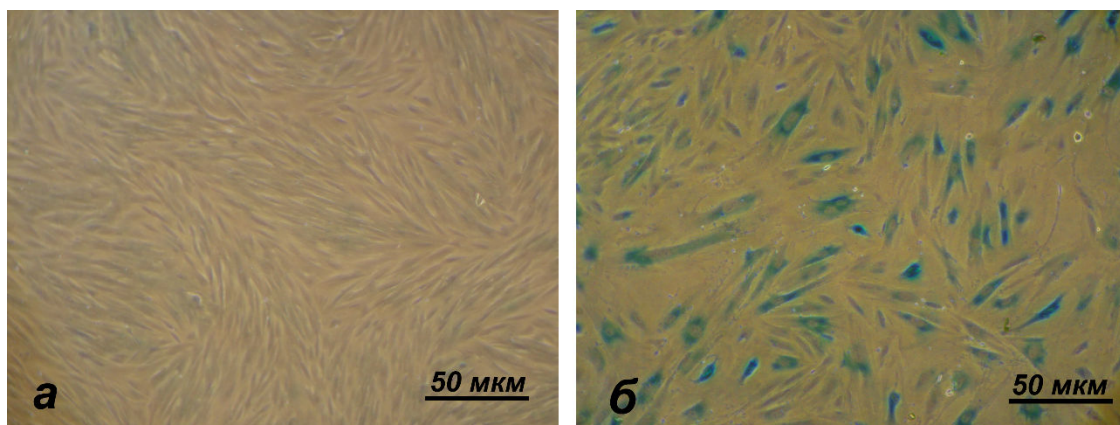


Рисунок 10. Окраска ЭМСК на активность β -галактозидазы

а- 8-й пассаж; б- 26-й пассаж.

Установлено, что несмотря на то, что пролиферативная активность эМСК снижается по мере культивирования, клетки сохраняли экспрессию характерных для эМСК поверхностных маркеров (Рисунок 11). Профиль экспрессии маркеров не менялся даже на очень поздних пассажах. Они по-прежнему были позитивны по маркерам МСК CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 и негативны по гематопоетическим маркерам CD34 и HLA-DR (класс II).

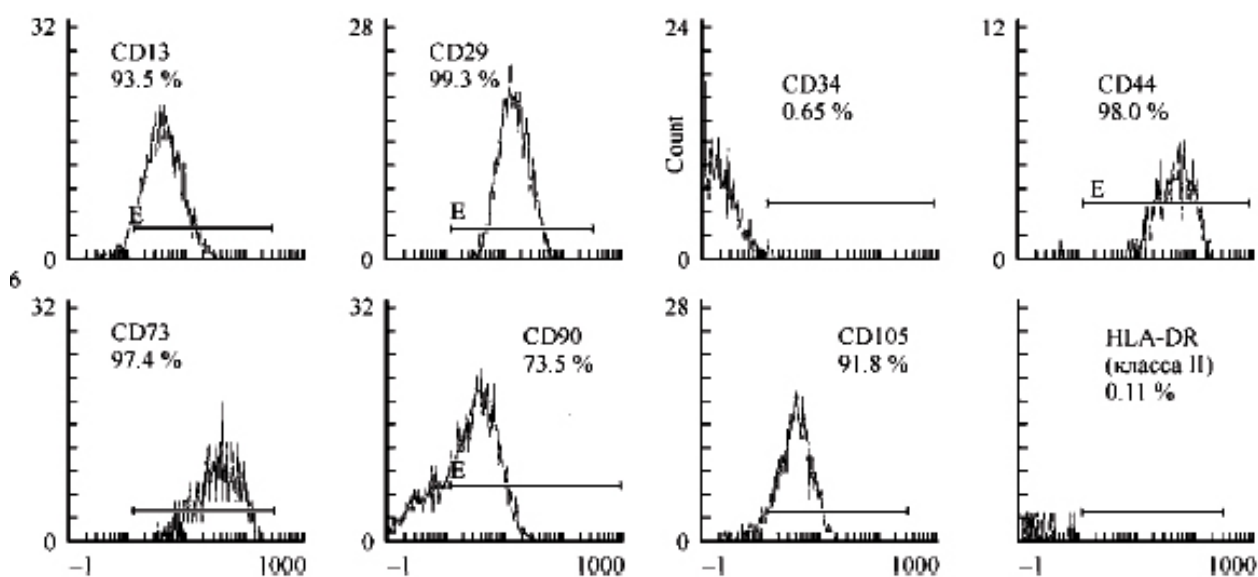


Рисунок 11. Экспрессия маркеров эМСК на 26 пассаже.

Нами было изучено влияние локальной трансплантации в стенку матки псевдобеременных крыс эМСК человека на рост и дифференцировку децидуальной ткани. Индукцию псевдобеременности у крыс осуществляли в фазу «эструс» раздражением влагалища электрическим током. Поскольку крыса имеет двурогую матку, полости которой не соединяются, удобно было использовать одно животное как экспериментальное и как контрольное. На 5-й день псевдобеременности в стенку левого рога матки трансплантировали суспензию эМСК человека в дозе 300 тыс. клеток в 10 мкл. Контрольным рогом служил правый рог матки, в стенку которого вводили 10 мкл PBS. Животных

вскрывали через 6 дней на 11 день псевдобеременности, поскольку в дальнейшем, без дополнительной гормонотерапии децидуальные клетки в матке крысы начинают гибнуть (Krehbiel, 1937). На Рисунке 12 представлена матка крысы после проведенного эксперимента. Видно увеличение опытного рога матки (левый) в сравнении с контрольным (правый) из-за сильного развития децидуальной ткани.

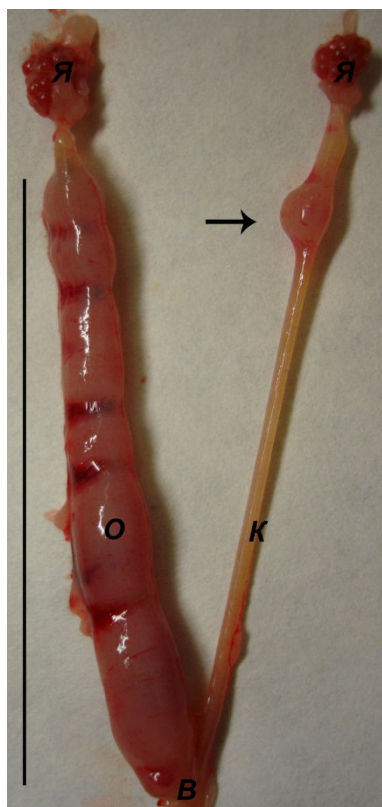


Рисунок 12. Матка крыс с участками децидуа после трансплантации эМСК человека.

О - опытный рог,

К – контрольный рог,

Я- яичники,

В – влагалищный конец матки.

Стрелкой указано развитие децидуальной ткани в контрольном роге, чертой указано развитие децидуальной ткани в опытном роге.

Анализ полученных гистологических срезов показал, что трансплантация эМСК не нарушает дифференцировку децидуальных клеток и организацию ткани. При микроскопическом изучении не было обнаружено очагов воспаления или некроза (Рисунок 13-16).

Было установлено, что трансплантация эМСК не нарушает структурную организацию децидуальной ткани и дифференцировку децидуальных клеток.

Децидуальная оболочка человека и грызунов, в т.ч., крыс и мышей, включает в себя три основных типов клеток, большие и малые децидуальные клетки и гранулярные клетки эндометрия.

В децидуальной оболочке крыс различают две основные области: с мезометральную и антимезометральную.

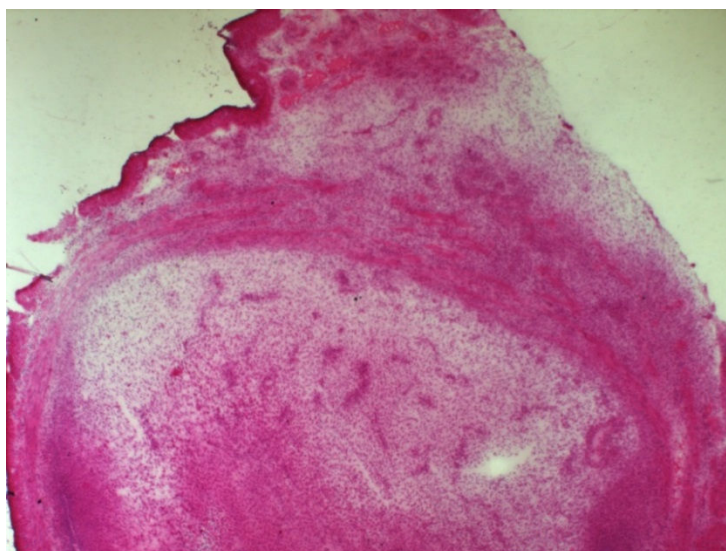


Рисунок 13. Мезометральная часть децидуа крыс

Гематоксилин-эозин, об. 2.5х, ок.10х

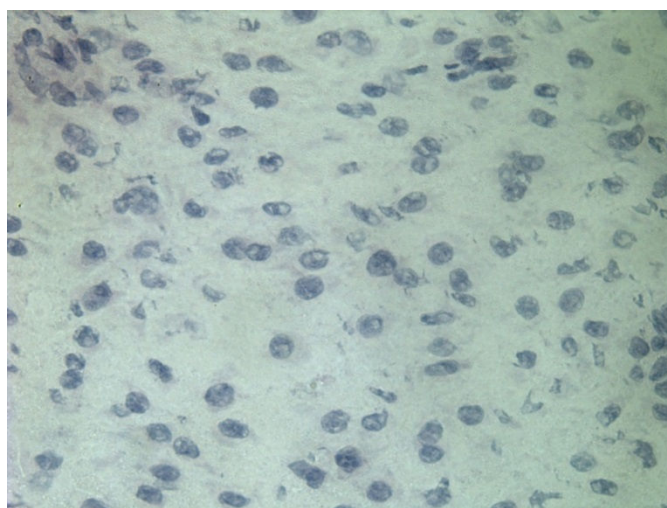


Рисунок 14. МДК мезометральной части децидуа крыс

Гематоксилин-эозин, об.40х, ок.10х.

Мезометральная часть децидуа, представленная на Рисунке 13, состоит из малых децидуальных клеток (МДК), между отростками которых распространяются гранулярные клетки эндометрия. При беременности, рост эктоплацентарного конуса эмбриона происходит в мезометральной части децидуа, в контакте с клетками которой формируется плацента. МДК представлены на Рисунке 14.

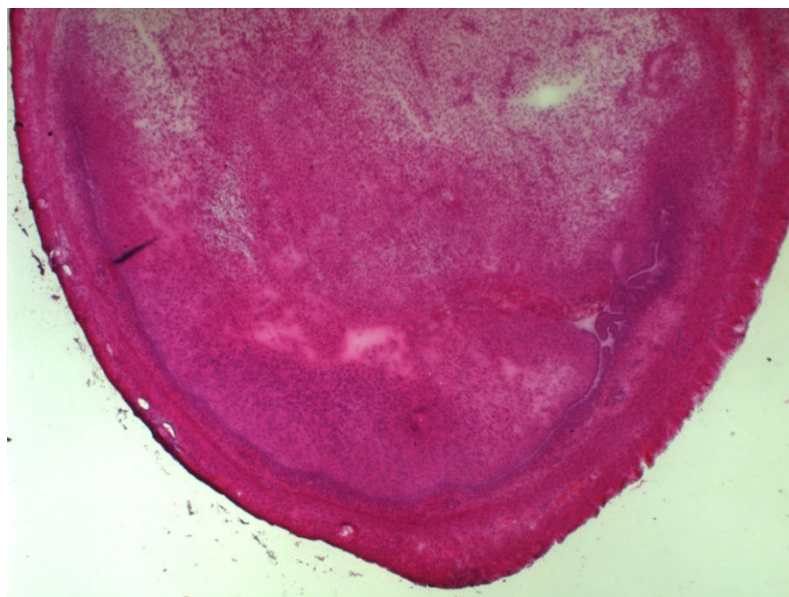


Рисунок 15. Антимезометральная часть децидуа крыс

Гематоксилин-эозин, об. 2.5х, ок. 10х

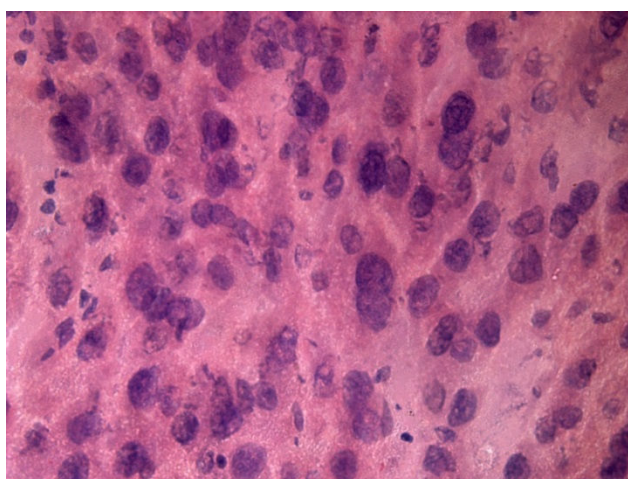


Рисунок 16. БДК антимезометральной стороны децидуа крыс.

Гематоксилин-эозин, об. 40х, ок. 10х.

Антимезометральная часть децидуа сформирована большими децидуальными клетками (БДК), представленными на Рисунке 16. При имплантации бластоцисты проникают из полости матки через маточный эпителий в эндометрий антимезометральной части матки и продолжают дальнейшее развитие, гаструляцию, в окружении БДК. Параллельно с ростом эмбрионального цилиндра увеличивается объем и толщина зоны БДК.

В отдельной серии экспериментов была проведена трансплантация эМСК, меченных флуоресцентными красителями. Трансплантированные эМСК человека были обнаружены в соединительно-тканной прослойке между децидуа и мышечной оболочкой рога матки в местах инъекций в стенку матки. В местах локализации трансплантированных клеток отсутствовала лейкоцитарная инфильтрация.

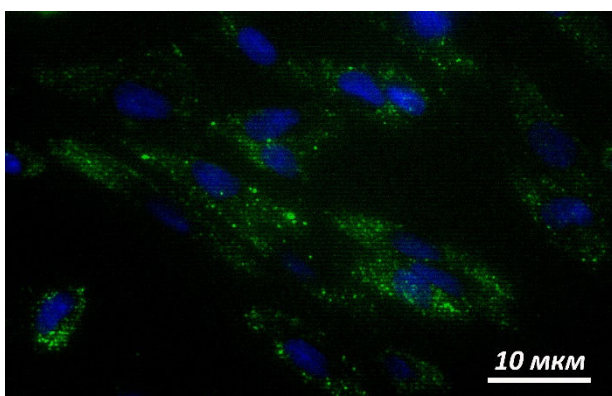


Рисунок 17. эМСК человека, меченные Hoechst 33342 и PKH 67 в культуре, Об 20х

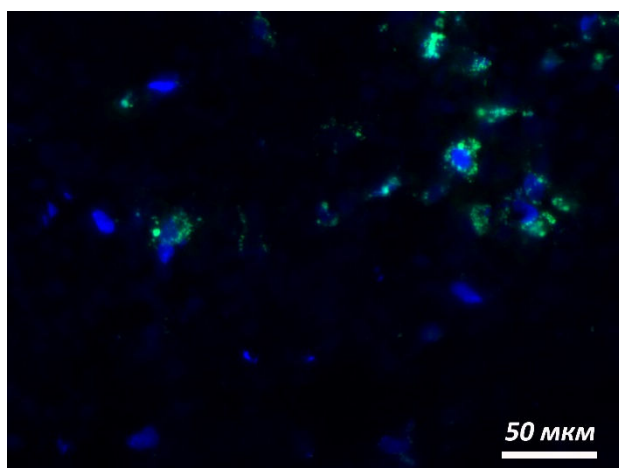


Рисунок 18. эМСК человека в децидуа крысы на 6-й день после трансплантации
(Hoechst 33342, PKH 67, Об 20х)

На Рисунке 17 показаны эМСК в культуре перед проведением трансплантации, меченные прижизненными красителями. Видны синие ядра, окрашенные Hoechst 33342 и зеленая мембрана клеток, меченная РКН 67. Обнаруженные в децидуальной ткани эМСК представлены на Рисунке 18. Так же видны синие ядра, меченные Hoechst 33342 и зеленые мембраны, окрашенные РКН 67.

В качестве контроля, для подтверждения стимулирующих свойств эМСК, а не их ксеногенного для крыс статуса, проводились эксперименты с использованием аутологичных ККМ крысы в аналогичной модели.

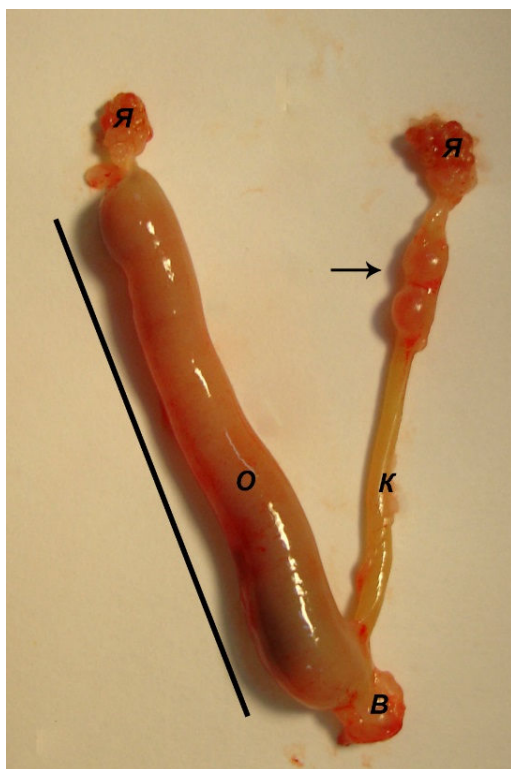


Рисунок 19. Матка крыс с участками децидуа после трансплантации ККМ крысы.

О - опытный рог,

К – контрольный рог,

Я- яичники,

В – влагалищный конец матки.

Стрелкой указано развитие децидуальной ткани в контрольном роге, чертой указано развитие децидуальной ткани в опытном роге.

Рисунок 19 иллюстрирует, что трансплантация ККМ крысы в матку псевдобеременным крысам так же стимулирует развитие децидуа, по сравнению с контрольным введением PBS. Заметно увеличение опытного рога (левый).

Результаты взвешивания опытных и контрольных рогов матки крысы показывают, что по соотношению масс увеличение ткани в опытном роге превосходит контрольный в более чем 3 раза как при трансплантации эмСК, так и при введении ККМ крысы (Рисунок 20).

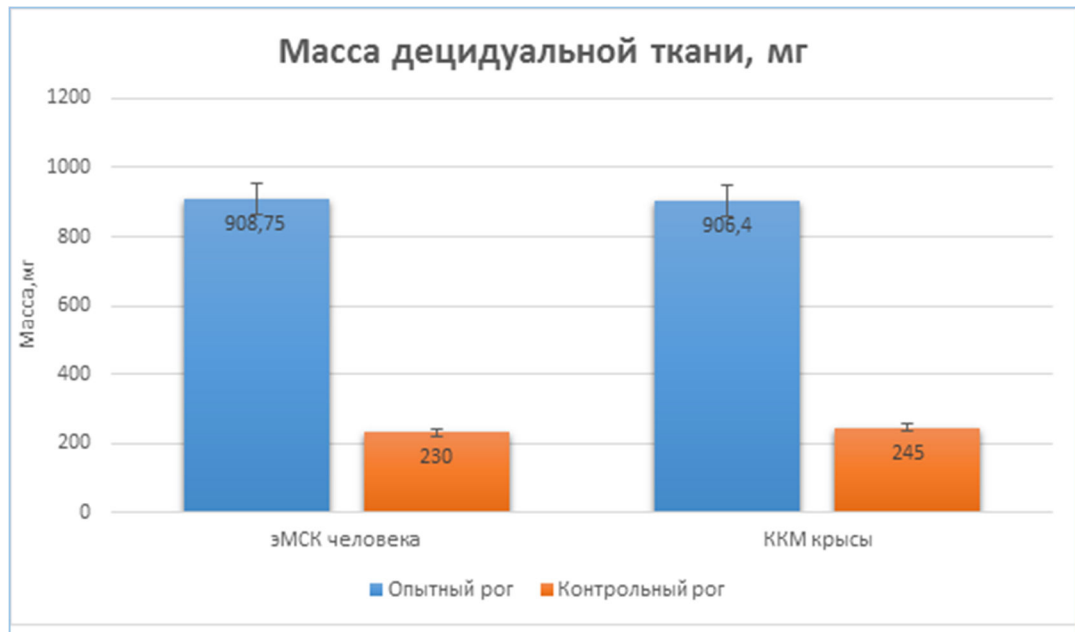


Рисунок 20. Результаты взвешивания децидуальной ткани крыс.

Для количественной оценки развития и правильности гистогенезов децидуальной ткани, наиболее оптимально оценивать децидуу в мезометрально-антимезометральном направлении, как показано на Рисунке 21, так как в этом направлении наблюдаются все типы цитогистогенезов децидуальной оболочки.

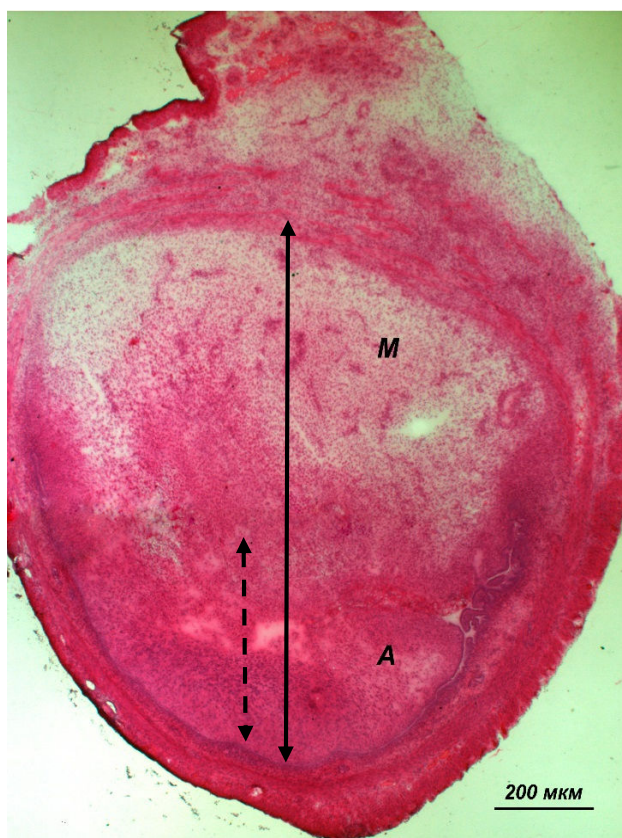


Рисунок 21. Поперечный гистологический срез матки крысы с развитой децидуальной тканью

М–мезометральная область, зона малых децидуальных клеток,
А–антимезометральная область, зона больших децидуальных клеток (Об. 10х),
 Стрелкой указана зона измерения. Штрихом указана область измерения зоны БДК.

Поскольку мезометральная и антимезометральная стороны децидуа крысы сформированы различными типами клеток. Долевое соотношение этих частей постоянно на каждом сроке беременности. Поэтому обнаружение отклонений соотношения долей этих двух гистогенезов можно трактовать как нарушение морфогенеза децидуальной оболочки. Доля антимезометральной части колеблется от 30 до 40% площади среза децидуа. Так как децидуа имеет овальную форму, измерение диаметра дает представление о размерах децидуа и позволяет сравнивать децидуа друг с другом по их площади.

Для оценки влияния трансплантации эмбриональной мезенхимы (ЭМСК) на дифференцировку БДК, как наиболее дифференцированных клеток, была определена толщина слоя БДК и вычислена её доля (%) в общем диаметре каждой децидуа. Результаты измерений приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Результаты морфометрии децидуа крыс после трансплантации эМСК человека и ККМ крысы.

<i>Рога матки</i>	<i>Диаметр срезов, мм</i>	<i>Доля зоны БДК (%) в общей толщине децидуа</i>
<i>Трансплантация эМСК человека (16 крыс)</i>	<i>4.3±0.5</i>	<i>35.4±3.6</i>
<i>Трансплантация ККМ крысы (14 крыс)</i>	<i>4.6±0.3</i>	<i>36.3±4.3</i>
<i>Введение PBS</i>	<i>2.6±0.5</i>	<i>31.8±1.6</i>

По данным морфометрии, представленным в Таблице 3, срезы децидуа, в которые трансплантировали эМСК человека, характеризовались увеличением диаметра в мезо-антимезометральном направлении примерно в 1.5-2 раза по отношению к диаметру срезов децидуа левого, контрольного рога.

Однако, процентное соотношение зон в децидуа не изменилось, по сравнению с контролем, что свидетельствует о правильном развитии ткани при трансплантации эМСК человека.

По представленным в Таблице 3 результатам можно также сделать вывод, что трансплантация ККМ крысы стимулирует развитие децидуальной ткани в такой же степени, что и трансплантация эМСК человека. Это доказывает, что эффект, полученный при трансплантации эМСК не является результатом влияния ксеногенной для крыс природы клеток человека.

Таким образом, псевдобеременность крыс является эффективной моделью для оценки влияния эМСК на функциональное состояние эндометрия. Было установлено, что трансплантация эМСК человека в месте будущего образования децидуа крыс существенно увеличивает рост децидуа по сравнению с контрольным рогом матки, сохраняя при этом организацию ткани и взаимное расположение дифференцированных клеток эндометрия.

ОБСУЖДЕНИЕ

В последнее время идет активный поиск альтернативных источников стволовых клеток органов и тканей человека. На сегодняшний день мезенхимные стволовые клетки являются самым распространенным материалом для клеточной терапии. Полученные нами новые линии ЭМСК отвечают всем критериям Международного общества клеточной терапии по определению мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека. Они обладают: 1) адгезивностью к пластику при стандартных условиях культивирования; 2) позитивной экспрессией CD105, CD73, CD90 и отсутствием экспрессии гемопоэтических маркеров CD19, CD34, CD45 и HLA-DR (класса II); 3) способностью дифференцироваться под воздействием определенных стимулов в другие клетки мезодермы *in vitro*.

Эндометрий человека, состоящий из эндометриальных желез, окруженных стромой – это динамическая ткань, претерпевающая около 400 циклов регенерации, дифференцировки и отслаивания. Мы показали, что именно фрагменты эндометрия, содержащегося в менструальной крови, являются источником стволовых клеток. Выделенные ЭМСК имеют типичную для всех мезенхимных стволовых клеток фибробластоподобную морфологию с характерными круговыми завихрениями.

Круглые клетки, обнаруживаемые на 1-м пассаже культивирования ЭМСК представляет собой «сайд популяцию». Японские ученые (Kato et al., 2007) выделили небольшую фракцию круглых CD9⁺CD13⁺ клеток эндометрия. CD13 известен как аминопептидаза N (150 кДа поверхностный гликопротеид), экспрессируется в эндометриальной строме в течение всего менструального цикла (Seli et al., 2001). CD9 - это

гликопротеин, с мол. массой 24–27 кДа, который экспрессируется на поверхности эпителиальных клеток эндометриальной железы во время менструального цикла (Park et al., 2000). Характерной особенностью выделенной популяции $CD9^-CD13^-$ клеток эндометрия является способность выбрасывать из клетки прижизненный ДНК-связывающий краситель Hoechst 33342 посредством АТФ-кассетного транспортера G2 (ABCG2⁺ клетки). Это свойство и является уникальной характеристикой «сайда популяции» (Goodell et al., 1996; Challen, Little, 2006). Ранее предполагалось, что ABCG2⁺ клетки локализуются преимущественно в базальном слое эндометрия. Но недавние исследования (Masuda et al., 2010) показали, что ABCG2⁺ клетки равномерно распределены по базальному и функциональному слоям. Две трети последнего и отслаиваются во время пролиферативной фазы менструального цикла. Присутствие ABCG2⁺ клеток в обоих слоях эндометрия позволяет предположить, что не только базальный, но и функциональный слой участвует в регенерации эндометриальной ткани.

Выделенные нами эМСК менструальной крови характеризуются высоким уровнем пролиферации. Время удвоения популяции составляет 26–27 ч. До момента старения, эМСК проходят более 45 удвоений популяции. Число удвоений популяции эМСК в значительной степени зависит от состояния здоровья (эндометрия) и возраста донора. Так, число удвоений для эМСК менструальной крови колеблется от 25–30 (Hida et al., 2008) до 68 в отдельных случаях (Meng et al., 2007), в которых указывается, что образцы менструальной крови донорами были молодые и здоровые женщины. Полученные нами стволовые клетки десквамированного эндометрия характеризуются высокой клоногенностью. Эффективность клонирования составляет около 60 %, что характерно и для МСК костного мозга (Smith et al., 2004).

Мультипотентность полученных эМСК менструальной крови подтверждена их способностью дифференцироваться в другие клетки мезодермы, такие как остеобласты и адипоциты. Эффективность адипогенной дифференцировки составила 70–80%, а остеогенной – около 30 %, что соответствует данным других исследователей (Patel et al., 2008). Кроме этого, полученные линии эМСК частично (более 50 %) экспрессируют маркер плюрипотентности SSEA-4, что также свидетельствует о мультипотентной пластичности данных клеток. Экспрессия поверхностного антигена SSEA-4, обычно определяющая плюрипотентный статус чЭСК, является характерной не только для эМСК менструальной крови (Patel et al., 2008), но и для МСК костного мозга (Gang et al., 2007). В некоторых публикациях, посвященных стволовым клеткам десквамированного эндометрия (Meng et al., 2007; Patel et al., 2008), указывается на экспрессию другого маркера чЭСК – Oct-4. Однако, у выделенных эМСК экспрессия маркера плюрипотентности Oct-4 не была выявлена ни иммунофлюоресценцией, ни ПЦР.

Изучением МСК человека, как источника стволовых клеток для лечения нейродегенеративных заболеваний, стали заниматься достаточно давно. Было обнаружено, что МСК костного мозга экспрессируют гены всех зародышевых листков еще до вступления в нейрогенез (Woodbury et al., 2002). Кроме этого, для наиболее изученных МСК костного мозга, показана экспрессия 12 нейрональных генов (включая маркер ранних нейрональных предшественников нестин), 8 дофаминэргических генов, и 11 нейрональных транскрипционных факторов (Blondheim et al., 2006). Предположение, что МСК костного мозга человека имеют predisposition к нейрогенезу, было далее подтверждено их дифференцировкой в дофаминовые нейроны *in vitro* и

успешной трансплантацией недифференцированных МСК крысам с моделированной болезнью Паркинсона (Trzaska et al., 2007). Позже, экспрессию нестина обнаружили и в МСК плаценты (Chen, et al., 2008). В 2008 году опубликовали данные иммунофлуоресцентного анализа маркера эктодермы бета-III-тубулина в МСК пуповинной крови (Zwart et al., 2008). Полученные нами эМСК менструальной крови экспрессируют антиген ранних нейрональных предшественников (нестин) и поздних нейрональных предшественников (бета-III-тубулин). Гипотеза о предрасположенности эМСК менструальной крови к трансдифференцировке в нейрональные и глиальные клетки подтверждается их успешной трансплантацией крысам с экспериментально вызванным инсультом (Hida et al., 2008; Toyoda et al., 2007).

Эффективное лечение с помощью клеточной терапии во многих случаях требует значительной биомассы стволовых клеток. В исходной ткани количество МСК, в том числе и эМСК, очень низкое, поэтому накопление требуемой биомассы клеток достигается их культивированием. Поскольку культивирование соматических клеток может сопровождаться существенными изменениями их свойств, в том числе возможной онкогенной трансформации, клетки, предназначенные для медицинских целей, должны строго оцениваться с точки зрения их биологической безопасности (Wang et al., 2012).

Исследованные нами линии эМСК морфологически и по экспрессии маркеров были схожи. Их пролиферативные характеристики оценивались по времени удвоения популяции, эффективности клонирования и по кривой роста. Время удвоения популяции в разных линиях варьировало в близких пределах от 26.7 до 28.6 ч, т.е. популяция

удваивалась примерно через сутки культивирования. Эти данные свидетельствуют об активном делении клеток. Для сравнения, время удвоения клеток костного мозга даже на ранних пассажах составляет около 60 ч (Røsland et al., 2009). Высокая эффективность клонирования эМСК (около 60 %) также свидетельствует о высоком пролиферативном потенциале данных клеток. Однако по мере культивирования пролиферативная активность клеток постепенно снижается. Анализ кривых роста эМСК на разных пассажах показал, что на 13-м пассаже клетки достигают стационарной фазы (остановки деления) позднее, чем на 5-м пассаже. Количество клеток на стадии плато (стационарной фазы) в культурах более поздних пассажей также уменьшается.

Установлено, что несмотря на то, что пролиферативная активность эМСК снижается по мере культивирования, клетки сохраняют экспрессию характерных для эМСК поверхностных маркеров. Профиль экспрессии маркеров не менялся даже на очень поздних пассажах. Они по-прежнему были позитивны по маркерам МСК CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 и негативны по гемапоэтическим маркерам CD34 и HLA-DR (класс II).

По мере культивирования морфология клеток изменяется. Исходные клетки имеют фибробластоподобную форму и образуют в процессе культивирования монослой. На поздних пассажах клетки увеличиваются в размере, уплощаются и не образуют плотного монослоя. Эти признаки характерны для клеточного старения. Для идентификации клеточного старения широко используется окраска на ассоциированную со старением SA- β -галактозидазы. Этот фермент является лизосомальной гидролазой и активен в норме при pH 4.0. Идентификация стареющих клеток основана на том, что в них этот

фермент проявляет свою активность при pH 6.0. По мере культивирования число SA- β -галактозидаза-позитивных клеток увеличивается и, в конце концов, достигает практически 100 %. В общей сложности все полученные нами линии прошли около 40—45 удвоений клеточной популяции, после чего клетки необратимо утратили способность делиться и постепенно погибли. Ни в одной линии не отмечено перерождения эМСК в трансформированные иммортализованные клетки.

Кариотипирование клеток трех линий эМСК с применением дифференциальной окраски хромосом на G-диски на ранних этапах культивирования (пассажи 3, 6) и более поздних (пассажи 15, 22) показало, что большинство проанализированных клеток имели структуру кариотипа, типичную для клеток человека в норме. На этом фоне с низкой частотой встречались клетки с отклонениями как по числу хромосом, так и в структуре кариотипа (появлялись анеуплоидные, околотетраплоидные клеточные варианты). Цитогенетические изменения были нескольких типов – эктопическая конъюгация между хромосомами, появление изохромосом, лишних хромосомных копий, поломок хромосомного материала. Выявленные в пределах каждой проанализированной клеточной популяции кариотипические изменения не были закономерными, не имели пролиферативного преимущества в процессе культивирования клеток и не препятствовали развитию репликативного старения.

В литературе также имеются сообщения о том, что в процессе длительного культивирования МСК из костного мозга и жировой ткани иногда наблюдаются численные хромосомные изменения (анеуплоидия) (Buyanovskaya et al., 2008; Tarte et al., 2010). Ни в одном случае

наблюдавшиеся хромосомные нарушения не приводили к трансформации МСК. Более того, описан случай трансплантации культуры МСК костного мозга с некоторыми цитогенетическими изменениями в структуре кариотипа пациенту. При наблюдении за пациентом в течение 2 лет, опухолей или других побочных эффектов у него не отмечали (Tarte et al., 2010).

Хорошо известно, что культивируемые фибробласты имеют ограниченный срок жизни *in vitro*. При длительном культивировании они постепенно исчерпывают пролиферативный потенциал и входят в фазу кризиса. Дальнейшая судьба клеток определяется их видовым происхождением. В культурах клеток грызунов большинство клеток в фазе кризиса погибает, но некоторые из них преодолевают ее, возобновляют деление и приобретают способность к неограниченному размножению, т.е. трансформируются (Rossi et al., 2003). В отличие от клеток грызунов культивируемые нормальные фибробласты человека имеют ограниченный срок жизни *in vitro* и не трансформируются (Hayflick, 1965). Их длительное культивирование сопровождается репликативным старением, в результате чего, в конце концов, клетки погибают.

Мезенхимные стволовые клетки являются мультипотентными и могут дифференцироваться в различные клеточные типы. Они имеют разное происхождение, но наибольшую перспективу для медицинских технологий имеют МСК человека, которые получают из костного мозга, жировой ткани, пуповинной и менструальной крови и др. Как правило, количества МСК в исходном материале недостаточно для трансплантации. Необходимое количество достигается последующим культивированием клеток. Поскольку длительное пассирование клеток

может сопровождаться их генетическими изменениями, а следовательно может быть не безопасно для пациентов при трансплантации, возник вопрос о возможной трансформации МСК человека при длительном культивировании.

Накопленные к настоящему времени данные противоречивы. Поскольку МСК, так же как и фибробласты, происходят из мезодермы и морфологически с ними сходны, можно было бы предполагать, что их поведение в культуре будет сходным. Действительно, МСК мышей, как и их фибробласты, при длительном культивировании трансформируются и иммортализируются (Гринчук и др., 2008; Попов и др., 2009), а длительное культивирование МСК из костного мозга человека, так же, как диплоидных фибробластов человека, не сопровождалось их спонтанной трансформацией (Bernardo et al., 2007). Тем не менее, появились публикации о спонтанной трансформации стволовых клеток жировой ткани человека (Rubio et al., 2005), клеток костного мозга (Røsland et al., 2009), нейрональных стволовых клеток (Wu et al., 2011). Однако эти публикации недавно были отозваны авторами. Оказалось имела место кросс-контаминация культур клетками постоянных опухолевых линий человека (Torsvik et al., 2012), т.е. факт спонтанной трансформации МСК не подтвердился.

При использовании метода ДНК фингерпринтинга с короткими тандемными повторами было установлено, что в одном случае контаминантами оказались клетки фибросаркомы человека HT1080, в другом - клетки HeLa. Тем не менее, некоторые авторы продолжают цитировать эти работы (Wang et al., 2012). Оказалось также, что кросс-контаминация опухолевыми клетками человека HeLa имела место и в работе со стволовыми нейрональными клетками человека (Shen et al.,

2012). Таким образом, достоверные сведения о возможной спонтанной трансформации стволовых клеток костного мозга и жировой ткани человека при длительном культивировании отсутствуют.

Хотя мы не нашли в литературе сообщений об исследованиях спонтанной трансформации эМСК, косвенно можно судить о ее отсутствии, поскольку в ряде работ указывают на ограниченный пролиферативный потенциал этих клеток. Наши данные по длительному культивированию нескольких линий эМСК показали, что, как и диплоидные фибробласты человека, все исследованные нами линии имели ограниченный срок жизни *in vitro*. По мере культивирования пролиферативный потенциал клеток всех линий исчерпывался, клетки вступали в фазу репликативного старения и, в конце концов, погибали. Ни одна линия не подверглась иммортализации.

Таким образом, неинвазивный и легко доступный способ получения, высокая пролиферативная активность (выше чем у МСК костного мозга и пуповинной крови), способность к длительному и стабильному культивированию, мультипотентность и отсутствие иммортализации при длительном культивировании делают МСК десквамированного эндометрия весьма перспективным источником стволовых клеток для клеточной терапии.

Одним из главных свойств МСК является их мультипотентность. Было показано, что эМСК имеют широкий дифференцированный потенциал и могут быть дифференцированы в 9 типов клеток трех зародышевых листков: мезодерму (костные, хрящевые, мышечные клетки, клетки сухожилий и связок), эктодерму (нейроны, астроциты, клетки эпидермиса) и энтодерму (печеночные, кишечные, панкреатические и легочные клетки) (Meng et al., 2007; Musina et al., 2008;

Patel et al., 2008). Способность эМСК менструальной крови к дифференцировке в миоциты и кардиомиоциты делает их прекрасным кандидатом для лечения мышечной дистрофии Дюшена и инфаркта миокарда, что и было показано на модели экспериментальных животных (Hida et al., 2008; Toyoda et al., 2007). Было описано, что нейронально коммитированные клетки менструальной крови оказывают терапевтический эффект при трансплантации крысам с экспериментально вызванным инсультом (Borlongan et al., 2010). Любопытно, что трансплантированные эМСК тормозят рост глиомы у крыс (Han et al., 2009). Этот эффект не был замечен при использовании других МСК. В одной работе было показано, что трансплантированные эМСК менструальной крови вызывают значительное увеличение концентраций дофамина у мышей с моделированной болезнью Паркинсона (Wolff et al., 2011). Интересно отметить, что во всех вышеперечисленных работах терапевтический эффект у животных (крыс) достигался без применения иммуносупрессантов. Это свидетельствует о низкой иммуногенности эМСК.

Учитывая эндометриальное происхождение данного типа МСК показалось интересным изучить их возможное применение для лечения гинекологических заболеваний.

Правильность прохождения всех процессов развития, особенно на стадиях образования децидуальной ткани и формирования плаценты, важно для имплантации эмбриона и успешного протекания беременности. При некоторых заболеваниях, когда нарушается трофика и нормальное функционирование клеток эндометрия, правильное развитие плаценты становится невозможным. Это приводит к выкидышам и бесплодию (Panayiotides et al., 2009). У человека

самопроизвольный аборт относят к основным видам акушерской патологии. Частота самопроизвольных выкидышей составляет от 15 до 20% от всех желанных беременностей. Несмотря на то, что привычное невынашивание является полиэтиологичным осложнением беременности, наиболее частыми причинами привычного невынашивания являются поражения эндометрия и недостаточное образование децидуальной ткани. Внутриматочные спайки (или синехии), образующиеся после инструментальных вмешательств или перенесенного эндометрита, диагностируются у 13,2% обследованных по поводу привычного невынашивания женщин (Бодяжина, 1973). Надо отметить, что при нарушении базального слоя эндометрия и появлении рубцов, восстановить его практически невозможно, поэтому при больших синехиях может развиваться стойкое бесплодие. Наиболее тяжелой формой внутриматочных спаек является синдром Ашермана. По литературным данным частота встречаемости синдрома Ашермана, у женщин, проходящих гистероскопию составляет 1,55%. У женщин с повторными выкидышами частота встречаемости данной патологии составляет до 39% (Greenblatt, 1969).

На сегодняшний день единственным способом лечения внутриматочных синехий является оперативный метод с последующей циклической гормонотерапией в течение следующих трех-шести месяцев. Однако имеются данные (Nagori, 2011, Zhao 2013) успешного применения аутологичных клеток костного мозга для лечения синдрома Ашермана. Нагори и соавторы описывают клинический случай бесплодия, возникшего в результате данного заболевания, при котором производилось внутриматочное введение CD9, CD44, и CD90 позитивных аутологичных клеток костного мозга пациентке, что в

последующем привело к увеличению толщины эндометрия и успешному развитию беременности.

В представленной работе было показано стимулирующее действие эМСК человека на развитие децидуальной ткани у псевдобеременных крыс. Масса развившейся ткани увеличивалась более чем в 3 раза. Данные литературы свидетельствуют о том, что основной механизм действия трансплантированных МСК состоит в секреции биологически активных молекул, что приводит к усилению ангиогенеза и репарации ткани, уменьшает образование фиброзной ткани (Caplan et al., 2009; Prockop et al., 2009). Кроме того МСК обладают противовоспалительным и иммуномодулирующим действием, а также активируют тканеспецифические прогениторные клетки. Имеются экспериментальные доказательства защитного действия трансплантированных клеток костного мозга, полученные на экспериментальных моделях повреждения сердечной мышцы (Alaiti et al., 2010). Наши данные подтверждают факт стимулирующего влияния трансплантированных эМСК на пролиферацию децидуальных клеток в экспериментальной модели псевдобеременности у крыс.

При беременности в клетках стромы эндометрия происходят специфические морфологические и биохимические изменения, обозначающиеся, как децидуальная реакция или дифференцировка децидуальной ткани. Децидуализация эндометрия - это необходимый процесс для имплантации зародыша, формирования плаценты и дальнейшего успешного протекания беременности. Клетки децидуальной ткани обеспечивают питание эмбриона и плода, секретирует пролактин, инсулиноподобный фактор роста и простогландины, поддерживает беременность, контролируя инвазивную

активность трофобласта и регулируя иммунологические отношения аллогенного плода и материнского организма. Децидуализация эндометрия развивается в результате воздействия бластоцисты на предварительно стимулированный эстрогенами и прогестероном эндометрий.

На моделях псевдобеременных грызунов было показано, что децидуальная реакция может развиваться и в отсутствии бластоцисты после травматизации гормонально стимулированного эндометрия. Псевдобеременность - это состояние, имеющее многие сходства с настоящей беременностью, такие как образование и поддержание функций желтого тела, развитие молочных желез, изменение состава маточной слизи и предрасположенность эндометрия к децидуализации. Индукцию псевдобеременности в эксперименте осуществляют электростимуляцией влагалища в стадии эструс или спариванием с вазотомированными самцами. Образовывающаяся в состоянии псевдобеременности «ложная» децидуа имеет одинаковое гистологическое строение с децидуа, развивающейся при нормальной имплантации (Krehbiel, 1937).

При анализе полученных гистологических срезов было обнаружено, что трансплантация ЭМСК человека в матку псевдобеременных крыс не нарушает дифференцировку децидуальных клеток и организацию децидуальной ткани. Известно, что антимезометральную часть децидуа грызунов занимают т.н. большие децидуальные клетки (БДК), аналоги БДК человека, составляющие основную массу клеток децидуа у человека и крыс. Доля антимезометральной части колеблется от 30 до 40% площади среза децидуа. Мезометральная часть децидуа, контактирующая с мезометральным треугольником, образована т.н.

малыми децидуальными клетками и гранулярными клетками эндометрия. Так как децидуа имеет овальную форму, величина диаметра дает представление о размерах децидуа и позволяет сравнивать децидуа друг с другом по их площади. Для оценки влияния трансплантации стволовых клеток на дифференцировку БДК, как наиболее дифференцированных клеток, была определена толщина слоя БДК и вычислена её доля (%) в общем диаметре каждой децидуа. По данным морфометрии срезы децидуа, в которые трансплантировали эМСК человека характеризовались увеличением диаметра в мезо-антимезометральном направлении примерно в 1.5-2 раза по отношению к диаметру срезов децидуа контрольного рога. Величина зоны БДК по отношению к другим тканевым структурам в сравнении с контролем оставалась неизменной. Отсюда можно сделать вывод, что трансплантация не изменяет структуру ткани, а увеличение размера децидуа происходит за счет более интенсивного развития всех тканевых элементов.

Для подтверждения стимулирующих свойств эМСК, а не их ксеногенного для крыс статуса, проводились эксперименты с использованием аутологичных ККМ крысы в аналогичной модели. Полученные результаты показали, что трансплантация ККМ крысы оказывает такой же эффект, как и трансплантация эМСК человека.

Трансплантированные эМСК человека были обнаружены в децидуальной ткани вблизи мышечной оболочки рога матки. В местах локализации трансплантированных клеток отсутствовала лейкоцитарная инфильтрация, так как децидуальная ткань является иммунологически привилегированным местом, в котором блокировано развитие воспалительной реакции. Иммуносупрессивные свойства децидуальной

ткани подтверждаются многими исследованиями. Имеются сообщения, что при трансплантации участков кожи в децидуализированную матку псевдобеременных крыс трансплантаты сохраняли жизнеспособность гораздо дольше, чем при трансплантации в матку, где отсутствовала децидуальная реакция (Beer, 1974, Kirkwood, 1981).

Современные репродуктивные технологии позволяют решить проблему бесплодия семейным парам с низкими показателями репродуктивного здоровья. Однако наступлении беременности после процедуры ЭКО происходит лишь в 30-40% случаях. Для того, чтобы имплантация эмбриона завершилась успешно, огромное значение имеет размер и структура эндометрия. Доказано, что благополучный исход экстракорпорального оплодотворения наблюдается чаще всего, если размер эндометрия к моменту переноса эмбриона составляет от 7 до 14 мм. При патологиях, которые затрагивают базальный слой эндометрия, восстановление эндометрия осложняется, что становится причиной неудач при процедуре ЭКО. Полученные в результате данной работы данные свидетельствуют о возможности использования ЭМСК и МСК из других тканевых источников для стимуляции развития эндометрия.

Иммунологический фактор составляет до 9% случаев невынашивания беременности. Согласно мнению некоторых авторов, существует пять категорий патологий иммунной системы, которые становятся причиной бесплодия (Kwak, 1998; Beer, 2000). Кроме таких факторов, как совместимость мужа и жены по HLA-антигенам, антифосфолипидный синдром, присутствие антиспермальных антител, авторы отмечают зависимость локального иммунитета от состояния эндометрия. Так, здоровый эндометрий небеременной женщины содержит небольшое количество В-, NK-, Т-клеток, а также макрофагов.

При хронических воспалительных процессах в эндометрии происходит увеличение количества NK-клеток, Т-лимфоцитов, макрофагов, увеличением лейкоцитарной инфильтрации эндометрия, а также мощный рост титров IgM, IgA, IgG. Активизирующиеся локальные иммунные реакции препятствуют нормальному осуществлению процессов инвазии, плацентации, развития хориона, что приводит к выкидышам. Современные подходы к лечению хронических воспалительных заболеваний репродуктивной системы не всегда дают положительный результат (Кулаков, 1996). Отмеченные у МСК иммуномодулирующие свойства могут быть использованы в решении проблем невынашивания при хроническом эндометрите (Prockop, 2009; Gargett 2010).

Таким образом по результатам работы можно сделать следующие **ВЫВОДЫ**:

ВЫВОДЫ

1. Выделенные из фрагментов десквамированного эндометрия, содержащегося в менструальной крови человека мезенхимные стволовые клетки (эМСК) экспрессируют специфические для МСК маркеры, дифференцируются в остеогенном и адипогенном направлении, имеют нормальный кариотип и по мере культивирования подвергаются репликативному старению. Полученные культуры эМСК могут быть использованы в качестве трансплантационного материала в экспериментальных исследованиях, направленных на решение проблем регенеративной медицины.
2. Разработан способ оценки влияния МСК на развитие эндометрия экспериментальных животных, основанный на трансплантации МСК псевдобеременным крысам.
3. Трансплантация эМСК человека в матку псевдоперемеженным крысам стимулирует рост децидуальной ткани не нарушая гистогенез ткани.
4. Трансплантация видоспецифических ККМ крысы в матку псевдобеременным крысам (контрольный вариант) стимулирует развитие децидуальной ткани у крыс в той же степени, что и трансплантация эМСК человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе был разработан метод выделения и культивирования МСК из фрагментов эндометрия, содержащихся в менструальной крови (эМСК). Полученные линии экспрессируют специфические для МСК маркеры, дифференцируются в остеогенном и адипогенном направлении, имеют нормальный кариотип. При длительном культивировании клетки сохраняют нормальный кариотип и не иммортализируются, а вступают в фазу репликативного старения.

По своим характеристикам полученные линии соответствуют МСК, выделяемым из других источников и могут рассматриваться как перспективный трансплантационный материал для целей регенеративной медицины. В настоящей работе терапевтические свойства полученных эМСК были исследованы в экспериментах на псевдобеременных крысах. Был разработан способ оценки влияния трансплантации эМСК на развитие децидуальной ткани эндометрия крыс. В результате трансплантации децидуальная ткань в матке развивалась интенсивнее по сравнению с контрольным введением PBS, что подтверждается изменением размера и морфометрическим анализом гистологических срезов. При проведении гистологического исследования было обнаружено, что трансплантация эМСК не нарушает дифференцировку децидуальных клеток и организацию ткани, сохраняя в образовавшейся децидуальной ткани взаимное расположение дифференцированных клеток.

В качестве исключения возможного влияния на результат ксеногенной природы эМСК человека в отдельной серии экспериментов на аналогичной модели была проведена трансплантация аутологичных клеток костного мозга (ККМ) крысы. Полученные результаты показали,

что трансплантация ККМ крысы оказывает практически такой же эффект, как и трансплантация ЭМСК человека. Таким образом, установлено, что трансплантация ЭМСК человека существенно стимулирует рост децидуальной ткани, по сравнению с контрольным рогом матки, сохраняя при этом организацию ткани и взаимное расположение дифференцированных клеток эндометрия. Полученные данные демонстрируют стимулирующее действие ЭМСК на развитие эндометриальной ткани в условиях псевдобеременности экспериментальных животных. Использование такой модели открывает новые подходы к исследованию влияния стволовых клеток на функционирование репродуктивной системы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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): 919-928.
2. 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
3. Domnina Alisa P., Zemelko Victoria I., Mikhailov Vyacheslav M., Nikolsky Nikolay N. (2013) «Stimulation of decidua development by transplantation of endometrial stem cells». J. Biomedical Science and Engineering. 6: 59-65
4. Домнина А.П., Михайлов В.М., Никольский Н.Н. (2014). «Влияние трансплантированных клеток костного мозга на развитие децидуальной оболочки у крыс». Цитология. 56(4) 268 -272
5. Домнина А.П., В.М. Михайлов, Н.Н. Никольский «Влияние стволовых клеток эндометрия на развитие децидуальной оболочки» 1-ый Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине 4–6 декабря 2013 г. Москва.
6. Домнина А.П., Михайлов В.М., Никольский Н.Н. «Влияние клеток костного мозга на развитие децидуальной оболочки.»;

Всероссийский симпозиум и Школа-конференция для молодых ученых по биологии клетки в культуре; г. Санкт – Петербург; 21 - 25 октября 2013 г. //Цитология. 55 (9): 635

7. Domnina A, Zemelko V, Mikhailov V & Nikolsky N. (2013). «Effect of endometrial stem cells transplantation on decidua formation in pseudopregnant rats». Regenerative Medicine, Issue 6: 155
8. Domnina A. P., Mikhailov V. M., Zemelko V. I. and Nikolsky N. N. «Stimulation of decidua development by transplantation of endometrial stem cells» Special Issue: 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013, July 2013 Volume 280, Issue Supplement s1, p. 453
9. Михайлов В.М., Домнина А.П., Никольский Н.Н «Способ стимуляции образования децидуальной оболочки эндометрия в эксперименте», положительное решение о выдачи патента от 21.01.2014.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. 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.
3. Allickson Ju.G., A.Sanchez¹, N.Yefimenko¹, C. V. Borlongan, P.R. Sanberg. 2011 Recent studies assessing the proliferative capability of a novel adult stem cell identified in menstrual blood. 2011. *Open Stem Cell J.*, 3: 4–10.
4. Allickson Ju.G. 2008. Menstrual blood stromal cells demonstrate a multipotent proliferative capacity in culture. *Cytotherapy.*; 10(Suppl 1):221.
5. Anisimov S.V., Morizane A., Correia A.S. 2010. Risks and Mechanisms of Oncological Disease Following Stem Cell Transplantation. *Stem Cell Rev and Rep.* 6:411–424.
6. Beer, A.E. and Billingham, R.E. 1974. Host responses to intrauterine tissue, cellular and fetal allografts. *Journal of Reproduction & Fertility.* 21: 59.
7. Bell. S.C. 1983. Decidualization: regional differentiation and associated function. *Oxford Reviews of Reproductive Biology.* 5: 220-271.
8. Bernardo M.E., Zaffaroni N., Novara F., Cometa A.M., Avanzini M.A., Moretta A., Montagna D., Maccario R., Villa R., Daidone M.G., Zuffardi O., Locatelli F. 2007. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and

do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res.* 67: 9142-9149.

9. Blondheim N.R., Levy Y.S., Ben-Zur T., Burshtein A., Cherlow T., Kan I., Barzilai R., Bahat-Stromza M., Barhum Y., Bulvik S., Melamed E., Offen D. 2006. Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition. *Stem Cells Dev.* 15 : 141–164.
10. Borlongan C. V., Kaneko Y., Maki M., Yu S.J., Ali M., Allickson J.G., Sanberg C. D., Kuzmin-Nichols N., Sanberg P. R. 2010. Menstrual Blood Cells Display Stem Cell–Like Phenotypic Markers and Exert Neuroprotection Following Transplantation in Experimental Stroke. *Stem Cells Dev.* 19 : 439–452.
11. Brosens J.J. and Gellersen B. 2006. Death or survival progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. *Journal of Molecular Endocrinology.* 36: 389-398.
12. Buyanovskaya O.A., Kuleshov N.P., Nikitina V.A., Voronina E.S., Katosova L.D., Bochkov N.P. 2008. Spontaneous aneuploidy and clone formation in adipose tissue stem cells during different periods of culturing. *Bull Exp. Biol. Med.* 146:344-347.
13. Caplan A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. 2009. *J. Pathol.* 217 :318-324.
14. Carpenter M. K., Rosler E. S., Gregory J., Fisk J. G., Brandenberger R., Ares X., Miura T., Lucero M., Rao M. S. 2004. Properties of four human embryonic stem cells lines maintained in a feeder-free culture system. *Develop. Dynamics.* 229 : 243—258.
15. 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.

16. Cervello' I, Gil-Sanchis C, Mas A, Delgado-Rosas F, Martí'nez-Conejero JA, et al. 2010. Human Endometrial Side Population Cells Exhibit Genotypic, Phenotypic and Functional Features of Somatic Stem Cells. *PLoS ONE* 5(6): e10964. doi:10.1371/journal.pone.0010964.
17. Cervello' I, Mas A, Gil-Sanchis C, Peris L, Faus A, et al. (2011) Reconstruction of Endometrium from Human Endometrial Side Population Cell Lines. *PLoS ONE* 6(6): e21221. doi:10.1371/journal.pone.0021221.
18. Challen G.A., Little M. 2006. A Side order of stem cells: the SP Phenotype. *Stem Cells*. 24 : 3–12.
19. Chen L., He D.M., Zhang Y. 2009. The differentiation of human placenta-derived mesenchymal stem cells into dopaminergic cells in vitro. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 14 : 528–536.
20. Cho N. H., Park Y. K., Kim Y. T., Yang, H., Kim, S. K. 2004. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil. Steril.* 81 : 403–407.
21. Coulam C. B., Clark D. A., Beer A. E., Kutteh W. H., Silver R., Kwak J., Stephenson M. (1997). Current clinical options for diagnosis and treatment of recurrent spontaneous abortion. Clinical Guidelines Recommendation Committee for Diagnosis and Treatment of Recurrent Spontaneous Abortion. *Am J Reprod Immunol.* 38(2):57-74.
22. Csemiczky G., Wramsby H., Johannisson E. and Landgren B.M. 1998. Importance of endometrial quality in women with tubal infertility during a natural menstrual cycle for the outcome of IVF treatment. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 15: 55-61.

23. Cui C.H., Uyama T., Miyado K., Terai M., Kyo S., Kiyono T., Umezawa A. 2007. Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. *Mol. Biol. Cell.* 18 : 1586–1594.
24. Dah-Ching Ding, Woei-Cherng, Shyu Shinn-Zong Lin. 2011. Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplantation*: 20: 5–14.
25. De Coppi P., Bartsch G. Jr., Siddiqui M.M., Xu T., Santos C.C., Perin L., Mostoslavsky G., Serre A.C., Snyder E.Y., Yoo J.J., Furth M.E., Soker S., Atala A. 2007. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat. Biotechnol.* 25 : 100–106.
26. Dmowski W.P. and Greenblatt R.B. 1969. Asherman's syndrome and risk of placenta accreta. *Obstetrics & Gynecology*: 34. 288-299.
27. 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.
28. Drexler, HG; Dirks, WG; Macleod, RA 1999. False human hematopoietic cell lines: cross-contaminations and misinterpretations. *Leukemia* 13 1601–1607.
29. Du H., Taylor H.S. 2007. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells.* 25 :2082-2086.
30. Edwards R. G., Sharpe D.J. 1971. Social Values and Research in Human Embryology. *Nature.* 231: 87-91
31. Finn C.A., Pope M.D., Milligan S.R. 1996. Relaxin and decidualization in mice: A reappraisal. *Biology of Reproduction.* 55: 1415-1418.
32. Finn C.A. and Keen P.M. 1963. The induction of deciduomata in the rat. *Journal of Embryology & Experimental Morphology.* 11: 673-682.

33. Friedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I., Frolova G.P. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation. 6 : 230–247.
34. Gang E. J., Bosnakovski D., Figueiredo C. A., Visser J. W., Perlingeiro R. C. 2007. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. Blood. 109 : 1743–1751.
35. Garcia S., A. Bernad M.C. Martin, J.C. Cigudosa. 2010. Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. Exp. Cell Res., 16:1648—1650.
36. Gargett C.E., Masuda H. 2010. Adult stem cells in the endometrium. Mol. Hum. Reprod. 16 : 818–834.
37. Gargett, C.E., 2004. Stem cells in gynaecology. Aust. N. Z. J.Obstet. Gynaecol., 44(5):380-386.
38. Gargett, C.E., 2007. Uterine stem cells: what is the evidence? Hum. Reprod. Update, 13(1):87-101.
39. Gargett, C.E. 2006. Identification and characterization of human endometrial stem/progenitor cells. Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynecology. 46: 250-253.
40. Giudice LC and Kao LC. 2004. Endometriosis. Lancet 364:1789–1799.
41. Goodell M.A., Brose K., Paradis G., Conner A.S., Mulligan R.C. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. J. Exp. Med. 183 : 1797–1806.
42. Grümmer R. 2006. Animal models in endometriosis research. Human Reproduction Update,12: 641–649.

43. Gu Y., Soares M.J., Srivastava R.K. and Gibori G. 1994. Expression of decidual prolactin-related protein in the rat decidua. *Endocrinology*. 135: 1422-1427.
44. Hanson C., Caisander G. Human embryonic stem cells and chromosome stability. 2005. *APMIS* 113 :751-755.
45. Han X., Meng X., Yin Z., Rogers A., Zhong J., Rillema P., Jackson J. A., Ichim T. E., Minev B., Carrier E., Patel A. N., Murphy M. P., Min W.P., Riordan N. H. 2009. Inhibition of intracranial glioma growth by endometrial regenerative cells. *Cell Cycle*. 8 : 606–610.
46. Harris D.T., Badowski M., Ahmad N., Gaballa M.A. 2007. The potential of cord blood stem cells for use in regenerative medicine. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 7 : 1311–1322.
47. Hayflick L. 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.* 37: 614–636.
48. Hentze, R H.. Graichen and A.Colman. 2006. Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts. *Trends in Biotechnology*, vol. 25 :25-32.
49. Hida N., Nishiyama N., Miyoshi S., Kira S., Segawa K., Uyama T., Mori T., Miyado K., Ikegami Y. 2008. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesen-chymal cells. *Stem Cells*. 26: 1695–1704.
50. Hoffman L. M., Carpenter M. K. 2005. Human embryonic stem cell stability. *Stem Cell Rev.* 1: 139—144.
51. Husein K.S., Thiemermann C. 2010. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem cells*. 28 : 585–596.
52. Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., Eden A., Yanuka O., Amit M., Soreq H., Benvenisty N. 2000. Differentiation of human embryonic

stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 6 : 88—95.

53. Jori F.P., Napolitano M.A., Melone M.A., Cipollaro M., Cascino A., Altucci L., Peluso G., Giordano A., Galderisi U. 2005. Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. *J Cell Biochem.* 94 : 645–655.
54. Kato K., Yoshimoto M., Kato K., Adachi S., Yamayoshi A., Arima T., Asanoma K., Kyo S., Nakahata T., Wake N. 2007. Characterization of side-population cells in human normal endometrium. *Hum. Reprod.* 22 : 1214–1223.
55. Kearns M., Lala P. K. 1982. Bone marrow origin of decidual cell precursors in the pseudopregnant mouse uterus. *J. Exp. Med.* 155 : 1537–1554.
56. Kim J.J., Taylor H.S., Lu Z, Ladhani O., Hastings J.M., Jackson K.S., Wu Y, Guo S.W. and Fazleabas A.T. 2007. Altered expression of HOXA10 in endometriosis: Potential role in decidualization. *Molecular Human Reproduction.* 13: 323-332.
57. Krehbiel R.H. 1937. Cytological studies of the decidual reaction in the rat during early pregnancy and in the production of deciduomata. *Physiological Zoology.* 10: 212- 234.
58. Lee J.B., Lee J.E., Park J.H., Kim S.J., Kim M.K., Roh S.I., Yoon H.S. 2005. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. *Biol. Reprod.* 72 : 42–49.
59. Lees J.G., Lim S.A., Croll T., Williams G., Lui S., Cooper-White J., McQuade L.R., Mathiyalagan B., Tuch B.E. 2007. Transplantation of 3D scaffolds seeded with human embryonic stem cells: biological features of

surrogate tissue and teratoma-forming potential. *Regen. Med.* 2 : 289–300.

60. Lin J, D. Xiang, Jin-long Zhang, J. AllicksonL, C. Xiang. 2011. Plasticity of human menstrual blood stem cells derived from the endometrium *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 2011 12(5):372-380
61. Li H., Fan X., Kovi R.C., Jo Y., Moquin B., Konz R., Stoicov C., Kurt-Jones E., Grossman S.R., Lyle S., Rogers A.B., Montrose M., Houghton J. 2007. Spontaneous expression of embryonic factors and p53 point mutations in aged mesenchymal stem cells: a model of age-related tumorigenesis in mice. *Cancer Res.* 67:10889–10898.
62. Ludwig T. E., Levenstein M. E., Jones J. M., Berggren, W. T., Mitchen E. R., Frane J. L., Crandall L. J., Daigh C. A., Conard K. R., Piekarczyk M. S., Llanas, R. A., Thomson J. A., 2006. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* 24 : 185–187.
63. Maitra A., Arking D. E., Shivapurkar N., Ikeda M., Stastny V., Kassauei K., et al.. 2005. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nature Genetics.* 37: 1099–1103
64. Maruyama T., H. Masuda, M. Ono, T. Kajitani, Y. Yoshimura. Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology 2010. *Reproduction* , 140:11–22.
65. Masuda H., Matsuzaki Y., Hiratsu E., Ono M., Nagashima T., Kajitani T., Arase T., Oda H., Uchida H., Asada H., Ito M., Yoshimura Y., Maruyama T., Okano H. 2010. Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. *PLoS ONE* 5 : e10387.

66. Meng X., Ichim T.E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K.W., Thébaud B., Riordan N.H. 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J. Transl. Med.* 5 : 57–66.
67. Mikhailov V.M. 2003. Life cycle of decidual cells. *Inter. Rev. Cytol.* 227: 1-63
68. Miura M., Miura Y., Padilla-Nash H.M., Molinolo A.A., Fu B., Patel V., Seo B.M., Sonoyama W., Zheng J.J., Baker C.C., Chen W., Ried T., Shi S. 2006. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells.* 24:1095–1103.
69. Montzka K, Lassonczyk N, Tschöke B et al., 2009. Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression *BMC Neuroscience*, 10:16.
70. 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
71. Murphy M.P., Wang H., Patel A.N., Kambhampati S., Angle N., Chan K., Marleau A.M., Pysznik A., Carrier E., Ichim T.E. et al. 2008. Allogeneic endometrial regenerative cells: an ‘Off the shelf solution’ for critical limb ischemia? *J. Transl. Med.* 6 : 45–52.
72. Musina R.A., Belyavsky A.V., Tarusova O.V., Solovyeva E.V. and Sukhikh G.T. 2008 Endometrial mesenchymal stem cells obtained from menstrual blood. *Biology and Medicine.* 2: 110-114.
73. Nagori C.B., Panchal S.Y. and 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. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 4: 43-48.
74. Padykula H.A., Coles L.G., Okulicz W.C., Rapaport S.I., McCracken J.A., King N.W.Jr., Longcope C., Kaiserman-Abramof I.R. 1989. The basalis of the primate endometrium: a bifunctional germinal compartment. *Biol. Reprod.* 40: 681–690.
 75. Padykula H.A. 1991. Regeneration in the primate uterus: the role of stem cells. *Ann. N Y Acad. Sci.* 622 : 47–56.
 76. 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.
 77. Parker A.M., Katz A.J. 2006. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Expert. Opin. Bio. Ther.* 6 : 567–578.
 78. Park K.R., Inoue T., Ueda M., Hirano T., Higuchi T., Maeda M., Konishi I., Fujiwara H., Fujii S. 2000. CD9 is expressed on human endometrial epithelial cells in association with integrins $\alpha_6\alpha_3$ and β_1 . *Mol. Human Reprod.* 6 : 252–257.
 79. Patel A.N., Park E., Kuzman M., Benetti F., Silva F.J., Allickson J.G. 2008. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant.* 17 : 303–311.
 80. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284 : 143–147.
 81. Prianishnikov V.A. 1978. On the concept of stem cell and a model of functional morphological structure of the endometrium. *Contraception*. 18 : 213–223.

82. Prockop D.J. 2009. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol. Ther.* 17 : 939-946.
83. Røsland G.V., Svendsen A., Torsvik A., Sobala E., McCormack E., Immervoll H., Mysliwietz J., Tonn J.C., Goldbrunner R., Lønning P.E., Bjerkvig R., Schichor C. 2009. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res.* 69:5331–5339.
84. Rossi O., Barbieri O., Frosina G. 2003. Time-course of spontaneous transformation of CD-1 mouse embryonic fibroblasts. *Anticancer Res.* 23:1373-1377.
85. Rubio D., Garcia-Castro J., Martín M. C., Fuente R., Cigudosa J.C., Lloyd A.C., Bernadet A. 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 65:3035–3039.
86. Ruiz A.M., Kwak J.Y., Kwak F.M., Beer A.E. (1996) Impact of age on reproductive outcome in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of immune etiology. *Am J Reprod Immunol.* 35 (4):408-14.
87. Rutane Rahkonen, E.M., Nuutila M., Sainio S., Saisto T. and Paavonen J. 2010. Elevated levels of decidual insulin-like growth factor binding protein-1 in cervical fluid in early and midpregnancy are associated with an increased risk of spontaneous preterm delivery. *BJOG.* 117: 701-710.
88. Salem K., Thiemermann C. 2010. Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status. *Stem Cells*,28:585–596.
89. Sasson I.E., H.S. Taylor 2008. Stem Cells and the Pathogenesis of Endometriosis. *Ann N Y Acad. Sci.* 1127: 106–115
Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet.* 11: 971 - 972.

90. Schüring, A.N., Schulte, N., Kelsch, R., Röpke, A., Kiesel, L., Götte, M., 2011. Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertil. Steril.*, 95(1):423-426.
91. Schwab K. E., Gargett C. E. 2007. Co-expression of two peri-vascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum. Reprod.* 22 : 2903–2911.
92. Schwab KE, Chan RW, Gargett CE. 2005. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil Steril.*: 84, Suppl 2, 1124-1130.
93. Schwab KE, Hutchinson P, Gargett C.E . 2008 Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells *Human Reproduction* 23: 934-943.
94. Seli E., Senturk L., Bahtiyar O.M., Kayisli U.A., Arici A. 2001. Expression of aminopeptidase N in human endometrium and regulation of its activity by estrogen. *Fertil. Steril.* 75 : 1172–1176.
95. Sethe S., Scutt A., Stolzing A. 2006. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res. Reviews*, 5: 91–116.
96. Shakhbazov AV, Goncharova NV, Kosmacheva SM., Kartel NA, Potapnev MP. 2009. Plasticity of Human Mesenchymal Stem Cell Phenotype and Expression Profile under Neurogenic Conditions. *Bull. Exper.Biol. Med.*,147: 513-516.
97. Shen L. 2012. In Reply to Torsvik et al. “Spontaneous Transformation of Stem Cells In Vitro and the Issue of Cross-Contamination.” *Int. J. Biol. Sci.* 8: 1053–1054.

98. Smith J. R., Pochampally R., Perry A., Shu-Ching Hsu, Prockop D. J. 2004. Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells*. 22 : 823–837.
99. Spencer TE, Hayashi K, Hu J, Carpenter KD. 2005. Comparative developmental biology of the mammalian uterus. *Curr Top Dev Biol*.68:85–122.
100. Swijnenburg R.J., Tanaka M., Vogel H., Baker J., Kofidis T., Gunawan F. , Lebl D.R., Caffarelli A.D., de Bruin J.L., Fedoseyeva E.V., Robbins R. 2005. Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation*. 112 : 166--172.
101. Tarte K., Gaillard J., Lataillade J-J. 2010. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*. 115:1549-1553.
102. Taylor H.S. 2004. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA*. 292:81-85.
103. Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282: 1145—1147.
104. Torsvik A., Røsland G.V., Bjerkvig R. 2012. Spontaneous Transformation of Stem Cells In Vitro and the Issue of Cross-Contamination. *Int. J. Biol. Sci*. 8:1051-1052.
105. Toshihiro K., Amanda R.G., Lea A.R., Jennifer K., Ho- Chen S.M., Khorshed A., Pengli B.M.A., Karim R. and Michael J.S. 2010. Subfertility linked to combined luteal insufficiency and uterine progesterone resistance. *Endocrinology*. 151: 4537-4550.

106. Trzaska K.A., Kuzhikandathil E.V., Rameshwar P. 2007. Specification of a dopaminergic phenotype from adult human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 25 : 2797-2808.
107. Toyoda M., Cui C., Umezawa, A. 2007. Myogenic transdifferentiation of menstrual blood-derived cells. *Acta. myol.* 26 : 176–178.
108. Wang S., Qu X., Zhao R.C. 2012. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J. Hematol. Oncol.* 5:19 – 20.
109. Wheeler JM .1989.Epidemiology of endometriosis-associated infertility. *J.Reprod Med* .34:41–46.
110. Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K.V., Tarasova, Y.,Wersto, R.P., Boheler, K. R. & Wobus, A.M. 2004. Nestin expression – a property of multilineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci.* 61: 2510-22.
111. Wisborg K., Ingerslev H., Henriksen T. (2010). In vitro fertilization and preterm delivery, low birth weight, and admission to the neonatal intensive care unit: a prospective follow-up study. *Fertil Steril.* 94(6):2102-6.
112. Wolff E.F., Gao X.B., Yao K.V., Andrews Z.B., Du H., Elsworth J.D., Taylor H.S. 2011. Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model. *J. Cell. Mol. Med.* 15 : 747–755.
113. Woodbury D., Reynolds A., Black I.B. 2002. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J. Neurosci. Res.* 96 : 908–917.
114. Wu W., He Q., Li X., Zhang X., Lu A., Ge R., Zhen H., Chang A. E., Li Q., Shen L. 2011. Long-term cultured human neural stem cells undergo

- spontaneous transformation to tumor-initiating cells. *Int. J. Biol. Sci.* 7: 892-901.
115. Yunis J.J. 1980. Nomenclature for high resolution human chromosomes. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2 : 221 – 229.
 116. Zhong Z., Patel A.N., Ichim T.E., Riordan N.H., Wang H., Min W.P., Woods E.J., Reid M., Mansilla E., Marin G.H., Drago H., Murphy M.P., Minev B. 2009. Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells. *J. Transl. Med.* 7 : 15–21
 117. Zwart I., Hill A.J., Girdlestone J., Manca M.F., Navarrete R., Navarrete C., Jen L.S. 2008. Analysis of neural potential of human umbilical cord blood-derived multipotent mesenchymal stem cells in response to a range of neurogenic stimuli. *J. Neurosci Res.* 86 : 1902– 1915.
 118. Берсенов А.В. Клеточная трансплантология – история, современное состояние и перспективы // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. №1,-2005, -С. 49-56.
 119. Гринчук Т. М., Иванцов К. М., Алексеенко Л. Л, Кожухарова И. В., Зайчик А. М., Петров Н. С., Михайлов В. М., Попов Б. В. 2008. Характеристика культуры мезенхимных стволовых клеток мышцы, экспрессирующих GPF. *Цитология.* 50 (12): 1030-1035.
 120. Должиков А.А. 2007. Морфология последа человека. Белгород. 41 с.
 121. 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. «Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования

эмбриональных стволовых линий человека», Цитология т.53, №12, с.919-928

122. Кожухарова И.В., Фридлянская И.И., Ковалева З.В., Пуговкина Н.А., Алексеенко Л.Л., Зенин В.В., Иванцов К.М., Леонтьева О.К., Гринчук Т.М., Никольский Н.Н. 2009. Новые линии эмбриональных стволовых клеток человека С612 и С910. Цитология. 51(7) : 551—558
123. Мамаева С.Е. 2002. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М.: Наука. 231 с.
124. Михайлов В.М. 1998. Жизненный цикл децидуальных клеток. Автореф. док. дис. Санкт-Петербург. 54 с.
125. Мусина Р.А., Бекчанова Е.С., Белявский А.В., Сухих Г.Т. 2006. Дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток разного происхождения. Кл. Техн. Биол. Мед. 1 : 39–43.
126. Мусина Р.А., Белявский А.В., Тарусова О.В., Соловьева Е.В., Сухих Г.Т. 2008. Мезенхимальные стволовые клетки эндометрия, полученные из менструальной крови. Кл. Техн. Биол. Мед. 2 : 110–114.
127. Никольский Н.Н., Габай И.А., Сомова Н.В. 2007. Эмбриональные стволовые клетки человека. Проблемы и перспективы. Цитология, 49: 529—537.
128. Попов Б.В., Петров Н.С., Михайлов В.М., Томилин А.Н., Алексеенко Л.Л., Гринчук Т.М., Зайчик А.М. 2009. Спонтанная трансформация и иммортализация мезенхимных стволовых клеток *in vitro*. Цитология. 51 (2) :91—102.

129. Сидельникова В. М. (2007). Невынашивание беременности — современный взгляд на проблему. «Акушерство и гинекология», №5: 24-27.
130. Татарова Н.А. 2002. Клинико-морфологические аспекты вынашивания и невынашивания беременности. Автореф. док. дис., Санкт-Петербург, 48 с.