

Еремичев Роман Юрьевич

**Безрубцовое восстановление эндометрия в ходе менструации: роль
тканеспецифичных свойств мезенхимальных стромальных клеток и
локально образуемых растворимых факторов**

1.5.22. – Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва
2022

Работа выполнена на кафедре биохимии и молекулярной медицины Факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Научный руководитель: кандидат медицинских наук
Макаревич Павел Игоревич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заслуженный врач РФ, заместитель директора ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова», директор института онкогинекологии и маммологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова»

Ашрафян Лев Андреевич
доктор медицинских наук, профессор, руководитель Центра биомедицинских и аддитивных технологий, заведующая кафедрой регенеративной медицины, гематологии молекулярной цитогенетики с курсом педиатрии МБУ ИНО ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.М. Бурназяна»
Астрелина Татьяна Алексеевна

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт цитологии Российской академии наук». г. Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4 (Россия, 194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4).

Защита диссертации состоится 22 декабря 2022 года в _____ часов на заседании диссертационного совета (24.1.204.02) Научно-исследовательского института морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» по адресу: 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Научно-исследовательского института морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» и на сайте <https://med.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор биологических наук

А.М. Косырева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Образование рубцовой ткани, вызываемое повреждением различных органов человека, представляет собой важнейшую проблему современной медицины вообще и регенеративной биомедицины в частности (Kisseleva et al., 2008; Rosenbloom et al., 2017). Фиброз или формирование рубца в толще органа устойчиво изменяет его структуру, значительно ограничивая эндогенные и терапевтические возможности восстановления функции (Wynn et al., 2012; Rockey et al., 2015). Постинфарктный кардиосклероз, контрактуры суставов после переломов, рубцевание кожи после обширных ожогов и ран, послеоперационные рубцы, стриктуры и спайки – очевидные примеры состояний, для которых отсутствует эффективное лечение ввиду невозможности восстановления нормальной структуры поврежденных тканей методами классической медицины. Желание изобрести способы такого восстановления создавало мотивацию для изучения механизмов заживления и регенерации (Dinsmore, 1991). Почему некоторые животные могут полностью восстанавливать нормальную структуру тела после утраты крупных его частей, а люди – нет? Этот вопрос был одним из первых в области изучения регенерации (Maden, 2018). Попытки ответа на него дали целый пласт важнейших научных результатов, убедительно показывающих, что у таких животных, как *hydra*, *planaria*, *danio rerio*, *axolotl*, регенерация происходит путем *эпиморфоза*, предполагающего отрастание новой части на месте утраченной, или *морфаллаксиса*, в результате которого происходит реорганизация сохранных частей организма до приобретения им нативной анатомической структуры (Bely et al., 2010). Перечисленные механизмы регенерации значительно отличаются от присущих человеку, из чего можно сделать вывод о том, что способность к регенерации обусловлена генетически и что её механизмы, скорее всего, видоспецифичны. С практической точки зрения это обозначает, что «обучить» человеческий организм регенерировать, задействовав механизмы, используемые другими видами, весьма маловероятно.

Относительно недавно стали появляться работы, применяющие не межвидовой, а внутривидовой сравнительный подход. У представителей многих животных некоторые части тела восстанавливаются после повреждения полностью, в то время как прочие органы восстанавливаются лишь частично. Сравнение механизмов этих двух типов восстановления у одного вида и является предметом изучения при внутривидовом сравнительном подходе. Примером подобных работ является сравнительный анализ механизмов образования рубца после ампутации конечности и регенерации после ампутации хвоста у ящериц (Alibardi, 2017; Ranadive et al., 2018). Такая постановка задачи позволяет сосредоточиться на анализе не видо-, а тканеспецифичных отличий механизмов восстановления.

В организме человека и других млекопитающих есть органы и ткани, способные восстанавливаться без образования рубца и регенерировать. Интересным примером является эндометрий, который обновляется уникальным для организма человека образом. В ходе каждой менструации большая его часть отторгается под действием эндогенных факторов, а затем восстанавливается без образования рубца, регенерируя таким образом до 400 и более раз в течение репродуктивного периода жизни женщины. Кроме того, эндометрий способен полностью восстанавливаться после родов, кесарева сечения, а также малых хирургических вмешательств (Johannisson et al., 1981; Ben-Nagi et al., 2009; Maybin et al., 2015; Deutsch et al., 2017).

Первыми исследователями, подробно описавшими на гистологическом уровне процессы, происходящие с эндометрием человека в ходе менструации, были E. Novak и R. W. Te Linde. J.E. Markee создал модель трансплантации эндометрия в переднюю камеру глаза макака-резус, позволившую наблюдать события в динамике при малом увеличении. H. Ludwig и A. Ferenczy расширили имевшийся объем знаний при помощи электронной микроскопии, а R. Garry с коллегами составили подробную гистероскопическую картину. Результатом работ перечисленных и ряда других авторов стало обнаружение высокой степени разрушения тканей эндометрия, а также признание факта развития в нём воспаления, происходящих в ходе менструации. Логично вытекающим из этих предпосылок вопросом о причинах отсутствия образования рубцовой ткани при восстановлении эндометрия впервые задалась L.A. Salamonsen, предположив также, что правильной стратегией их поиска будет проведение сравнительных исследований с органами, заживающими путем образования рубца. Однако в её дальнейших работах, как и в работах других авторов, ставивших аналогичные вопросы, не применялся сравнительный подход. Механистические исследования, выполненные O. D. Slayden, T. J. Kaitu'u-Lino, X. Fan, H. P. GaideChevronnay, J. Evans, F. L. Cousins и рядом других ученых, позволили выявить факторы, влияющие на скорость и степень восстановления эндометрия, но причины, по которым не происходит образования рубца, так и не были определены. Выяснение этих причин поможет выявить тканеспецифичные особенности механизмов восстановления эндометрия, а кроме того, поможет понять, возможно ли применить полученные таким образом знания для разработки методов индукции безрубцового восстановления тканей в других органах человека.

В последние десятилетия было проведено множество исследований, направленных на выявление механизмов образования рубцовой ткани и фиброобразования, происходящих при восстановлении поврежденных органов. Основным эффекторным звеном были признаны резидентные клетки стромы (преимущественно фибробласты и перициты), непосредственно осуществляющие образование новой соединительной ткани (фиброплазию) и

совершающие при этом фенотипический переход в миофибробласты (Hinz, 2016; Rodrigues et al., 2019; Plikus et al., 2021). Моделирование данных процессов *in vitro* оказалось возможным с использованием мезенхимальных стромальных клеток, культуры которых выделяют как из органов, восстанавливающихся путем образования рубца (в частности, кожи), так и из эндометрия, восстановление которого во время менструации не сопровождается выраженной фиброплазией и появлением миофибробластов (Maybin et al., 2015). Вместе с тем развитие регенеративной медицины способствовало проведению множества сравнительных исследований мезенхимальных стромальных клеток, получаемых из различных источников, показавших наличие у них автономных (сохраняющихся *in vitro*) тканеспецифических свойств (Farkhad et al., 2021).

На основе совокупности приведённых предпосылок нами было выдвинуто предположение о том, что отсутствие образования рубцовой ткани может объясняться либо устойчивостью выделенных из эндометрия мезенхимальных стромальных клеток к фиброплазии и фенотипическому переходу в миофибробласты, либо образованием в эндометрии в ходе менструации растворимых факторов, подавляющих данные процессы.

Цель

Определить, обладают ли мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из менструального отделяемого, устойчивостью к фиброплазии и фенотипическому переходу в миофибробласты *in vitro*, а также выяснить, образуются ли в эндометрии в ходе менструации растворимые факторы, способные подавлять фиброплазию и фенотипический переход мезенхимальных стромальных клеток в миофибробласты *in vitro*.

Задачи

1. Получить охарактеризованные по минимальным критериям соответствия международного общества клеточной терапии культуры мезенхимальных стромальных клеток менструального отделяемого, дермы и жировой ткани.
2. Оценить способность мезенхимальных стромальных клеток менструального отделяемого, дермы и жировой ткани к фиброплазии и фенотипическому переходу в миофибробласты *in vitro*.
3. Оценить действие растворимых факторов, образующихся в эндометрии в ходе менструации, на культуры мезенхимальных стромальных клеток менструального отделяемого, дермы и жировой ткани в отношении фиброплазии и фенотипического перехода в миофибробласты.

Научная новизна

Обнаружено, что мезенхимальные стромальные клетки менструального отделяемого обладают сопоставимой с мезенхимальными стромальными клетками дермы и жировой ткани способностью к фенотипическому переходу в миофибробласты *in vitro*. Установлено, что

растворимые факторы, образуемые при восстановлении эндометрия в ходе менструации, противодействуют фенотипическому переходу мезенхимальных стромальных клеток менструального отделяемого, дермы и жировой ткани в миофибробласты *in vitro*. Выявлены тканеспецифичные особенности, присущие культурам мезенхимальных стромальных клеток менструального отделяемого, заключающиеся в их устойчивости к фиброплазии и высокой степени колокализации коллагена I типа и ДД-А фибронектина, находящихся во внеклеточном пространстве.

Теоретическая и практическая значимость

Исследование расширяет фундаментальные представления о механизмах безрубцового восстановления эндометрия в ходе менструации. Обнаружены тканеспецифичные особенности мезенхимальных стромальных клеток менструального отделяемого, которые представляются важными для безрубцового восстановления эндометрия. Получены результаты, указывающие на образование в эндометрии растворимых факторов, удерживающих мезенхимальные стромальные клетки от фенотипического перехода в миофибробласты, то есть противодействующих фиброзированию. В перспективе полученные знания могут быть использованы в целях регенеративной медицины.

Методология и методы исследования

Методология диссертационного исследования основана на постановке основного вопроса исследования, анализе литературы, формулировке гипотезы, а также цели исследования и задач, направленных на дальнейшую экспериментальную проверку выдвинутого предположения. Дизайн экспериментов и подбор методов исследования осуществлялся в соответствии с поставленными целями и задачами таким образом, чтобы обеспечить их достижение и выполнение. В работе использовались цитологические (выделение, культивирование, дифференцировка, окрашивание гистохимическими красителями, иммунофенотипирование и иммунофлуоресцентный анализ мезенхимальных стромальных клеток менструального отделяемого, дермы и жировой ткани, а также клеточные *in vitro* модели фиброплазии и контракции); биохимические (иммуноферментный анализ, электрофорез и иммуноблоттинг) и статистические методы научного исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Мезенхимальные стромальные клетки менструального отделяемого, дермы и жировой ткани соответствуют критериям международного общества клеточной терапии и относятся к одному типу клеток *in vitro*.

2. Мезенхимальные стромальные клетки менструального отделяемого способны совершать фенотипический переход в

миофибробласты *in vitro* сопоставимо с мезенхимальными стромальными клетками дермы и жировой ткани.

3. Растворимые факторы, образуемые при восстановлении эндометрия в ходе менструации, удерживают мезенхимальные стромальные клетки менструального отделяемого, дермы и жировой ткани от фенотипического перехода в миофибробласты *in vitro*.

4. Мезенхимальные стромальные клетки менструального отделяемого устойчивы к фиброплазии *in vitro*, в отличие от мезенхимальных стромальных клеток дермы и жировой ткани.

5. Мезенхимальные стромальные клетки менструального отделяемого, в сравнении с мезенхимальными стромальными клетками дермы и жировой ткани, обладают устойчивой особенностью взаимного расположения коллагена I типа и ДД-А фибронектина, заключающейся в высокой степени их колокализации во внеклеточном пространстве *in vitro*.

Степень достоверности данных

Статистическая обработка результатов и первичных данных проводилась с использованием программы StatPlus v.7.3.3.0 (AnalystSoft Inc., США). Результаты исследования доложены на ведущих российских и зарубежных научных конференциях и опубликованы в рецензируемых журналах, в том числе входящих в Q1.

Публикации и внедрение

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе, 4 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, в том числе в журналах, индексируемых Scopus и Web of Science, из которых 2 статьи в журналах Q1. Методы выделения сыворотки и мезенхимальных стромальных клеток менструального отделяемого внедрены в работу Лаборатории генно-клеточной терапии института регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова.

Апробация

Результаты работы были представлены на III и IV Национальных конгрессах по регенеративной медицине в Москве (15-18 ноября 2017 г.; 20-23 ноября 2019 г.); 27-м Конгрессе Европейского общества генной и клеточной терапии ESGCT (22-25 октября 2019 г., Барселона, Испания); 21-м ежегодном Конгрессе Американского общества генной и клеточной терапии ASGCT, США (16-19 мая 2018 г.). Апробация работы проведена на заседании кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, состоявшемся по адресу Ломоносовский проспект, д. 27 к. 10.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ключевая роль в формулировке гипотезы, постановке цели и задач диссертационного исследования. Вся работа, за исключением иммуноферментного анализа, выделения стромальных клеток

дермы и жировой ткани, а также формирования коллагеновых дисков для модели контракции, была выполнена автором лично. Методы выделения и культивирования мезенхимальных стромальных клеток менструального отделяемого, а также метод выделения сыворотки менструального отделяемого были впервые внедрены автором в работу коллектива. При подготовке публикаций по теме исследования автором диссертационной работы подготовлены тексты рукописей и тезисов, а также иллюстративные материалы.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 97 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 15 рисунками и 9 таблицами. Список литературы включает 136 источников.

Диссертация соответствует паспорту специальности: 1.5.22 – клеточная биология

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) выделяли из менструального отделяемого (МСКМ), дермы (МСКД) и жировой ткани (МСКЖТ), после чего наращивали до 2-3 пассажа и криоконсервировали. Перед проведением всех последующих экспериментов клетки размораживали и культивировали до 4-5 пассажа, на которых оценивали иммунофенотип и мультипотентность. Эксперименты по оценке способности исследуемых МСК к фенотипическому переходу в миофибробласты, а также действия на них растворимых факторов, образуемых при восстановлении эндометрия в ходе менструации, проводили в трех повторах, для каждого из которых одновременно брали по одной культуре МСКМ, МСКД и МСКЖТ.

Забор использованного в исследовании биоматериала и все дальнейшие процедуры проводили с письменного согласия доноров и одобрения локального этического комитета МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова (IRB00010587), протокол №4 (2018).

Выделение сыворотки и МСК из менструального отделяемого.

Менструальное отделяемое разбавляли в 2 раза средой DMEM/F12 (Gibco, США), после чего центрифугированием (300g, 20 мин) разделяли на супернатант, который представлял собой стерильный 25-30% раствор сыворотки менструального отделяемого (СМО), и осадок, из которого центрифугированием (500g, 40 мин) на фиколле (1,077 г/см³, Панэко, Россия), с последующей адгезией к культуральному пластику требуемых клеток, выделяли МСКМ. Полученные линии культивировали так, как изложено в разделе «Культивирование МСК».

Выделение сыворотки периферической крови (СПК).

Периферическую венозную кровь (10-15 мл) получали однократным забором в пробирки с активатором свертывания (BD Vacutainer, США) из кубитальной вены во второй день менструации от доноров менструального отделяемого.

Выделение МСКЖТ. Образцы жировой ткани измельчали хирургическими ножницами, после чего подвергали ферментативной обработки коллагеназой I типа и диспазой. Полученную суспензию центрифугировали (200g, 10 мин), супернатант и флотирующую фракцию утилизировали, а осадок фильтровали через 100 мкм нейлоновые фильтры (BD Falcon, США), после чего ресуспендировали в полной среде роста и переносили в чашку Петри, в CO₂ инкубатор. Через 24 часа среду меняли на свежую, а клетки культивировали так, как изложено в разделе «Культивирование МСК».

Выделение МСКД. Образцы кожи измельчали ножницами и перемещали в 50 мл пробирку. Ферментативную обработку проводили коллагеназой I типа и диспазой. Полученную суспензию центрифугировали (200g, 10 мин), супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в полной среде роста и перемещали в чашку Петри, в CO₂ инкубатор. Через 24 часа среду снова меняли, после чего клетки культивировали так, как изложено в разделе «Культивирование МСК».

Культивирование МСК. Клетки культивировали в чашках Петри (TPP, Швейцария) в соответствующей среде роста: МСКМ – в DMEM/F12 (Gibco, США) с 10% ФБС (HyClone, США), МСКЖТ – в Advance Stem Medium (HyClone, США) с 10% Advance Stem Supplement (HyClone, США), МСКД – в DMEM с низкой глюкозой (Gibco, США) с 10% ФБС (HyClone, США). Замену среды производили каждые 2-4 дня; по достижении 80-90% конфлюэнтности клетки пассировали в соотношении 1:3-1:4. Как в процессе наращивания культур, так и в ходе всех дальнейших экспериментов культивирование проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂.

Имунофенотипирование МСК методом проточной цитометрии. Клетки открепляли от пластика и метили антителами, специфичными к CD73, CD90, CD105, CD14, CD20, CD34, CD45 и CD31, а также соответствующими контрольными изотипическими антителами. Детекцию флуоресценции проводили на проточном цитометре BD LSR Fortessa (BD, США). Полученные результаты анализировали в программе FlowJo (BD, США).

Адипогенная, остеогенная и хондрогенная дифференцировки. Для индукции дифференцировки исследуемых МСК в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях использовали «StemPro Adipogenesis Differentiation Kit», «StemPro Osteogenesis Differentiation Kit» и «StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit» (все три – Gibco, США) по инструкции

производителя. Изображения получали методом микроскопии в проходящем свете.

Оценка способности МСК к фиброплазии в стандартных условиях культивирования. МСК культивировали в 24-луночных планшетах в течение 14 суток без пассирования с регулярной сменой среды роста. По завершении периода культивирования ядра клеток метили DAPI (Sigma-Aldrich, США). Изображения получали методом флуоресцентной и фазово-контрастной микроскопии.

Оценка способности МСК к индуцируемому ТФР- β фенотипическому переходу в миофибробласты. МСК культивировали в 24-луночных планшетах и в 60 мм чашках Петри до 100% конfluence, после чего среду меняли на одну из следующих:

- DMEM/F12 (Gibco, США) + 10 нг/мл БСА + 100 мкМ магния аскорбилфосфата (Sigma, США)
- DMEM/F12 (Gibco, США) + 10 нг/мл ТФР- β 1 (CellSignalingTechnology, США) + 100 мкМ магния аскорбилфосфата (Sigma, США)

Через 48 часов среды меняли на свежие, а через 96 часов клетки в 60 мм чашках Петри лизировали в буфере Лэммли (BioRad, США) для иммуноблоттинга; клетки в 24-луночных планшетах использовали для иммунофлуоресцентного анализа. В полученных образцах далее определяли белки-маркеры миофибробластов и степень фосфорилирования SMAD2.

Оценка способности МСК к контракции. МСК помещали в 1,5 мл пробирки в количестве 40, 80 или 160 тыс, после чего ресуспендировали в 400 мкл DMEM (Gibco, США) с добавлением 10 нг/мл ТФР- β 1 или БСА (Cell Signaling Technology, США). Затем дополнительно вносили 200 мкл свиного коллагена (3 мг/мл в 0,1% уксусной кислоте, Имтек, Россия), который нормализовали 1М NaOH (Panreac, США). Из 500 мкл полученной суспензии в 24-луночном планшете формировали диски, к которым затем добавляли по 400 мкл среды DMEM (Gibco, США), открепляя от стенок. Съемку флотирующих дисков проводили в начале эксперимента и затем каждые 24 часа в течение 4 суток. В полученных изображениях вычисляли относительную площадь коллагенового диска (в % от площади лунки), а для каждой культуры МСК была вычислена средняя относительная площадь диска (в %), которую использовали для оценки контракции.

Оценка концентрации ТФР- β 1 в исследуемых образцах сывороток. Для измерения концентрации ТФР- β 1 в растворах СМО, СПК и ФБС использовали «TGF- β 1 Quantikine ELISA Kit» (R&D Systems, США) по инструкции производителя. Оптическое поглощение в лунках планшета измеряли на спектрофотометре EnVision VICTOR X3 (Perkin Elmer, США).

Оценка действия растворимых факторов, образуемых при восстановлении эндометрия в ходе менструации, на МСК в отношении фиброплазии и фенотипического перехода в миофибробласты. МСК культивировали в 24-луночных планшетах, в 60 мм чашках Петри и в чашках Петри для конфокальной микроскопии (Ibidi, Германия) до 100% конfluence, после чего среду меняли на одну из следующих:

- 10% раствор СПК в DMEM/F12 (Gibco, США)
- 10% раствор СМО в DMEM/F12 (Gibco, США)
- 10% раствор ФБС (HyClone, США) в DMEM/F12 (Gibco, США)

Через 48 часов среды меняли на свежие, а через 96 часов клетки в 60 мм чашках Петри лизировали в буфере Лэммли (BioRad, США) для иммуноблоттинга, а клетки в 24-луночных планшетах и в чашках Петри фиксировали для иммунофлуоресцентного анализа. В полученных образцах далее определяли белки-маркеры миофибробластов.

Определение в полученных клеточных лизатах уровня белков-маркеров миофибробластов и степени активации SMAD-зависимого сигнального пути методом иммуноблоттинга. Электрофорез белков проводили по методу Лэммли (Laemmli 1970), а иммуноблоттинг по методу Towbin (Towbin et al. 1979). Мембраны блокировали раствором обезжиренным молоком, после чего инкубировали с первичными антителами к α -гладкомышечному актину (α -ГМА), винкулину, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (ГАФД), SMAD2, фосфорилированному SMAD2 (pSMAD2), коллагену I типа или содержащему дополнительный домен A (ДД-А) фибронектину с последующей инкубацией с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (ИМТЭК, Россия). Люминесцентный сигнал после добавления субстрата детектировали на ChemiDoc Touch (BioRad, США), а для последующей цифровой денситометрии использовали программу Image Lab (BioRad, США).

Оценка белков-маркеров миофибробластов методом иммунофлуоресцентного анализа. Иммунофлуоресцентное мечение проводили непосредственно в лунках планшетов или чашках Петри для конфокальной микроскопии. Клетки фиксировали 4% раствором формальдегида (Panreac, США) на ФСБ, после чего перед мечением первичными антителами α -ГМА и винкулина пермеабелизировали раствором Тритона-X100 (Panreac, США), а перед мечением коллагена I типа и ДД-А фибронектина пермеабелизацию не проводили. Для блокировки неспецифического связывания использовали козью сыворотку (Thermo Fisher Scientific, США). После отмывки образцов от первых антител проводили инкубацию с соответствующими вторыми антителами (Invitrogen, США). Ядра метили DAPI (Sigma-Aldrich, США). По завершении протокола мечения образцы анализировали методами флуоресцентной или конфокальной микроскопии с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа

Leica DMi8 с камерой DFC7000T или конфокального микроскопа Leica TCS SP5 соответственно. Обработку и анализ полученных изображений проводили в программе Fiji (НИН, США), применяя соответствующие плагины.

Статистический анализ данных. Статистический анализ данных проводился в программе StatPlus v.7.3.3.0 (AnalystSoft Inc., США). Для оценки нормальности распределений использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Для сравнения двух зависимых выборок использовали критерий Стьюдента или критерий Вилкоксона, а для двух независимых – критерий Манна-Уитни. Однофакторный дисперсионный анализ и критерий Ньюмена-Кеулса использовали для сравнения более двух независимых выборок. Для всех перечисленных статистических критериев использовали уровень значимости $\alpha = 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Оценка соответствия культур МСКМ, МСКД и МСКЖТ минимальным критериям международного общества клеточной терапии. При типировании МСК, использованных в ходе выполнения данной работы, мы ориентировались на минимальные критерии международного общества клеточной терапии (ISCT): адгезивность к пластику, положительность по CD73, CD90, CD105, отрицательность по маркерам эндотелиальных, гемопоэтических и иммунокомпетентных клеток, способность к дифференцировке *in vitro* в адипо-, остео- и хондрогенном направлениях (Dominici et al., 2006; Viswanathan et al., 2019).

Поскольку применяемые нами протоколы выделения и культивирования были основаны на адгезивности клеток к пластику какого-либо дополнительного подтверждения данного свойства не требовалось. Иммунофенотип анализировали методом проточной цитометрии. Для оценки относительной представленности положительных по исследуемым маркерам клеток использовали 2% отсежку по контрольным образцам. Во всех исследуемых культурах более 90% клеток были положительны по CD73, CD90, CD105 и отрицательны по CD31, CD34, CD14, CD20, CD45. Сравнительный анализ не выявил значимых отличий между МСКМ, МСКД и МСКЖТ (рис. 1, А). Вместе с тем, мы показали, что все исследуемые культуры были способны к адипогенной, остеогенной и хондрогенной дифференцировкам. Аналогичные результаты были получены другими авторами в отношении МСКМ, МСКД и МСКЖТ по-отдельности (Zuk et al., 2001; Meng et al., 2007; Haniffa et al., 2009).

Принимая во внимание результаты анализа иммунофенотипа и дифференцировочного потенциала исследованных культур, мы заключили, что МСКМ, МСКД и МСКЖТ принадлежат к одному типу клеток, отвечающему минимальным критериям ISCT, что позволяло вести дальнейший поиск тканеспецифичных различий между ними.

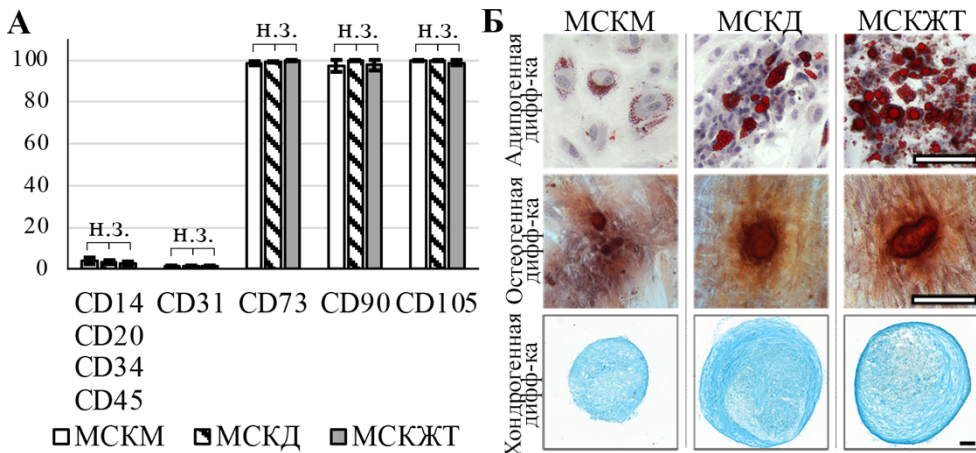


Рисунок 1. МСК, выделенные из менструального отделяемого, дермы и жировой ткани, соответствуют критериям ISCT. **А.** Сравнительный анализ содержания положительных по исследуемым CD клеток в культурах МСК. Данные представлены как среднее \pm стандартное квадратичное отклонение; $n=3$, однофакторный дисперсионный анализ, н.з. – не значимо ($p>0,05$). **Б.** Дифференцировка исследуемых МСК в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях *in vitro*. Жировые капли окрашены масляным красным, минеральные отложения – ализариновым красным, гликозамингликаны – альциановым синим. Световая микроскопия. Масштабный отрезок 100 мкм.

Оценка способности МСКМ, МСКД и МСКЖТ к фиброплазии. Для оценки способности к фиброплазии исследуемые МСК культивировали без пассирования в течение 14 дней. По завершении данного периода МСКД и МСКЖТ, в отличие от МСКМ, образовывали клеточные пласты (рис. 2). Попытки сформировать клеточный пласт из МСКМ путем их высаживания на пластик в высокой плотности также не приводили к ожидаемому результату.

Обнаруженные нами особенности МСКМ объясняют отсутствие выраженной фиброплазии при восстановлении эндометрия в ходе менструации, и, как следствие, отсутствие образования рубцовой ткани. Вместе с тем, это не объясняет отсутствия фиброзирования, поскольку для развития данного процесса достаточно трансформации в миофибробласты клеток стромы, изначально находящихся в тканях (Rockey et al., 2015).

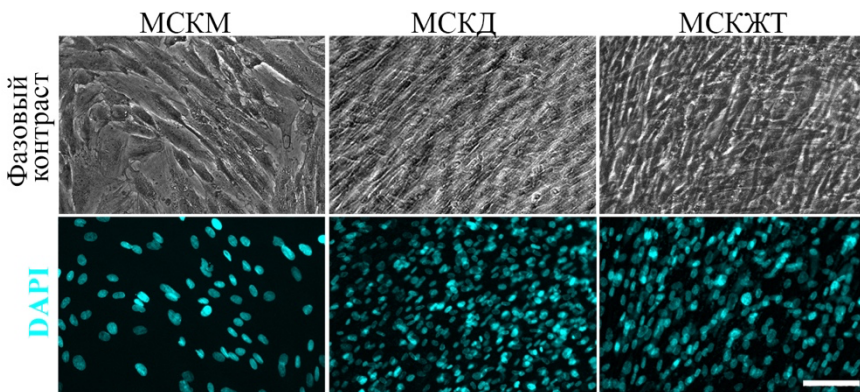


Рисунок 2. МСКМ устойчивы к фиброплазии *in vitro*. Клеточные пласты в культурах МСКД и МСКЖТ, но не МСКМ, на 14 день культивирования без пассирования. Ядра помечены DAPI. Масштабный отрезок 100 мкм.

Оценка способности МСКМ, МСКД и МСКЖТ к фенотипическому переходу в миофибробласты. Для моделирования фенотипического перехода в миофибробласты МСК культивировали в присутствии ТФР- β 1 в течение 4 суток, после чего оценивали активацию канонического сигнального пути данного фактора роста и изменение соответствующих клеточных маркеров.

Оценка активации SMAD-зависимого сигнального каскада в МСК под действием ТФР- β 1. SMAD-зависимый сигнальный каскад является каноническим для ТФР- β 1 и активируется как в МСК *in vitro*, так и в клетках стромы *in vivo* (Kim et al., 2018; Lodyga et al., 2020). В качестве исследуемой мишени мы остановились на SMAD2, поскольку фосфорилирование данного белка подтверждает факт сборки и активации рецепторного комплекса (Kim et al., 2018).

Во всех исследуемых культурах, в том числе в МСКМ, мы обнаружили индуцированное ТФР- β 1 увеличение содержания pSMAD2 (рис. 3, А). Статистически значимые различия при оценке по 3 донорам были показаны для МСКМ и МСКД (рис. 3, Б). Недостижение критического уровня значимости для МСКЖТ объяснялось скорее высокой вариабельностью степени ответа первичных культур, поскольку мы наблюдали выраженное увеличение уровня pSMAD2 у клеток от всех трех доноров.

На основе подтвержденной чувствительности исследуемых культур к ТФР- β 1 мы могли ожидать сопоставимых изменений в отношении маркеров миофибробластов, а в случае выявления выраженных отличий между исследуемыми МСК считать их обусловленными тканеспецифическими свойствами данных клеток.

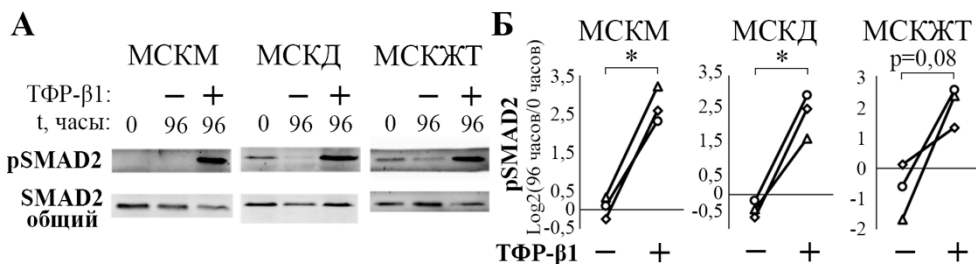


Рисунок 3. ТФР-β1 активирует фосфорилирование SMAD2 в МСКМ, МСКД и МСКЖТ. **А.** Репрезентативные результаты иммуноблоттинга лизатов МСКМ, МСКД и МСКЖТ, полученных до начала эксперимента (дорожка «0») и через 96 часов культивирования с добавлением БСА (дорожка «-/96») или ТФР-β1 (дорожка «+/96»). **Б.** Денситометрический анализ результатов иммуноблоттинга. Для контроля загрузки использовали уровень общего SMAD2, а для нормировки между донорами – уровень pSMAD2 до начала эксперимента. При статистическом анализе log-трансформированных данных применен t-критерий для зависимых выборок; n=3, * p<0,05.

Оценка продукции и депонирования белков ВКМ в культурах МСКМ, МСКД, МСКЖТ под действием ТФР-β1. ДД-А фибронектин и коллаген I типа являются одними из основных белков ВКМ – маркеров миофибробластов, продукция которых усиливается под действием ТФР-β1 в культурах МСК при моделировании *in vitro* соответствующего фенотипического перехода (Hinz, 2016).

В нашей модели оценка изменения содержания данных белков производилась при помощи иммуноблоттинга, а верификация их депонирования во внеклеточном пространстве – при помощи иммунофлуоресцентного анализа. Мы обнаружили значимое увеличение уровня коллагена I типа во всех исследованных культурах, в то время как для ДД-А фибронектина статистически значимый результат был получен только для МСКМ (рис. 4, А, Б). Для МСКД и МСКЖТ была обнаружена сходная, но слабо выраженная тенденция.

При иммунофлуоресцентном анализе мы метили только внеклеточно локализованные коллаген I типа и ДД-А фибронектин. Во всех исследованных культурах мы обнаружили выраженное депонирование коллагена I типа и ДД-А фибронектина во внеклеточном пространстве в присутствии ТФР-β1 (рис. 4, В). Вместе с тем, анализируя паттерн депонирования белков ВКМ, мы выявили в культурах МСКМ значимо большую колокализацию коллагена I типа и ДД-А фибронектина (рис. 4, Г).

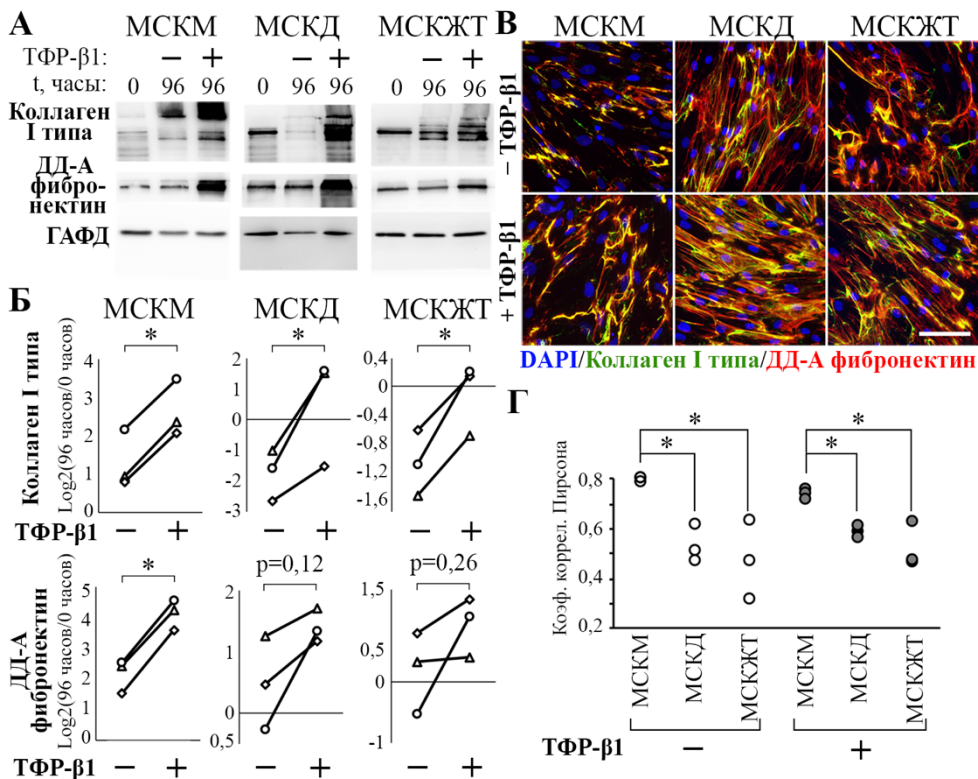


Рисунок 4. ТФР-β1 увеличивает содержание коллагена I типа и ДД-А фибронектина, не изменяя степень их колокализации, в культурах МСКМ, МСКД и МСКЖТ. **А.** Репрезентативные результаты иммуноблоттинга лизатов МСКМ, МСКД и МСКЖТ, полученных до начала эксперимента (дорожка «0») и через 96 часов культивирования с добавлением БСА (дорожка «-/96») или ТФР-β1 (дорожка «+/96»). **Б.** Денситометрический анализ результатов иммуноблоттинга. Для контроля загрузки использовали уровень ГАФД, а для нормировки между донорами – уровень исследуемого белка в начале эксперимента. При статистическом анализе log-трансформированных данных применен t-критерий для зависимых выборок; n=3, * p<0,05. **В.** Иммунофлуоресцентное мечение коллагена I типа и ДД-А фибронектина в культурах МСКМ, МСКД и МСКЖТ. Ядра помечены DAPI; масштабный отрезок 100 мкм. **Г.** Степень колокализации коллагена I типа и ДД-А фибронектина в культурах МСКМ, МСКД и МСКЖТ. Точками на графике представлены значения коэффициента корреляции Пирсона; однофакторный дисперсионный анализ и критерий Ньюмена-Кеулса были использованы для статистического анализа данных; n=3, * p<0,05.

Таким образом, с точки зрения изменения продукции коллагена I типа и ДД-А фибронектина ответ МСКМ на ТФР- β 1 был сопоставимым с другими исследуемыми МСК. Однако они обладали тканеспецифичной особенностью колокализации данных белков ВКМ, которая сохранялась независимо от действия ТФР- β 1.

Оценка способности МСКМ, МСКД и МСКЖТ к приобретению контрактильного фенотипа под действием ТФР- β 1. Основным внутриклеточным маркером миофибробластов является α -ГМА. Активация канонического сигнального каскада ТФР- β 1 через рецептор-активируемые SMAD непосредственно приводит к усилению его экспрессии в МСК *in vitro* (Hinz, 2016; Kim et al., 2018). Включаясь затем в состав фибриллярного актина, α -ГМА становится частью сократительного аппарата, сообщающегося посредством винкулина с контактами фокальной адгезии, а через них – с ВКМ. При этом для фенотипического перехода в миофибробласты характерно не увеличение содержания винкулина в клетке, а его перераспределение и скопление в виде кластеров на концах актиновых фибрилл (Hinz et al., 2019).

Методом иммуноблоттинга мы обнаружили, что действие ТФР- β 1 вызывало увеличение уровня α -ГМА во всех исследуемых культурах МСК. Значимые изменения уровня α -ГМА по 3 донорам были выявлены для МСКД и МСКМ, в то время как для МСКЖТ показана схожая тенденция (рис. 5, А, Б). Во всех случаях МСКЖТ отвечали на ТФР- β 1 увеличением уровня α -ГМА, а отсутствие статистической значимости результатов объяснялось высокой вариабельностью ответа культур, полученных от разных доноров.

При иммунофлуоресцентном анализе обращало на себя внимание появление множества α -ГМА положительных стресс-фибрилл во всех исследуемых культурах, находившихся под действием ТФР- β 1 (рис. 5, В). Данные изменения были наиболее заметны в МСКД, что было связано с отсутствием α -ГМА-положительных стресс-фибрилл в отрицательном контроле, в то время как в соответствующих контрольных образцах МСКМ и МСКЖТ они присутствовали. Кроме того, под действием ТФР- β 1 происходило перераспределение винкулина с образованием его выраженных кластеров во всех исследуемых культурах (рис. 5, Г).

Взаимное расположение α -ГМА и винкулина было характерным для фенотипа миофибробластов (рис. 5, Д). Концы стресс-фибрилл примыкали к кластерам винкулина, локализующихся, как правило, у контактов фокальной адгезии.

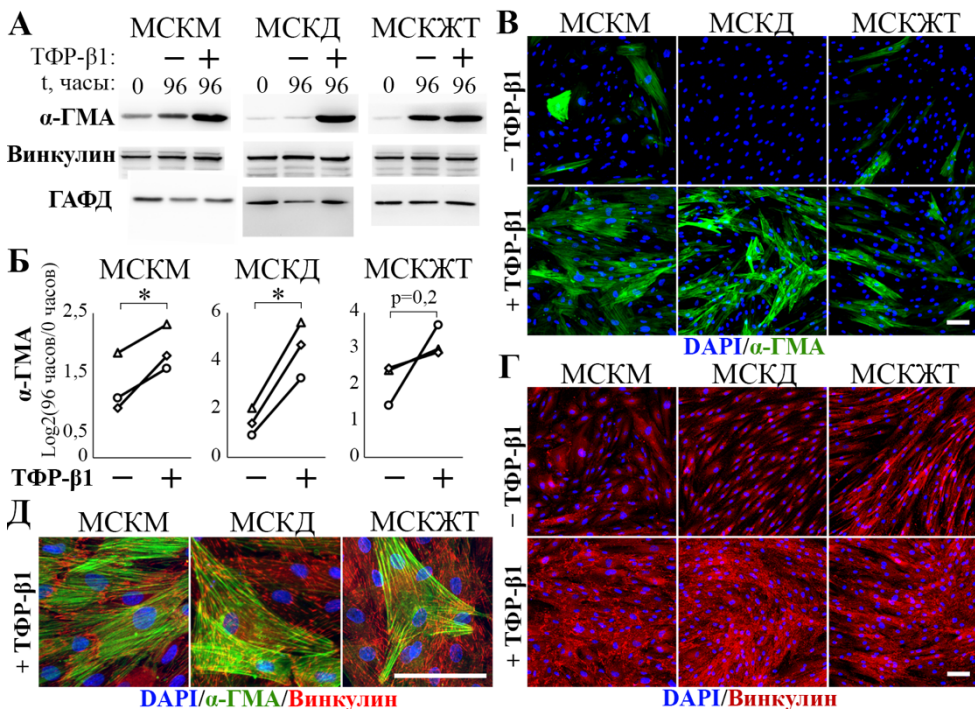


Рисунок 5. МСКМ, МСКД и МСКЖТ приобретают сократительный фенотип под ТФР-β1 *in vitro*. **А.** Репрезентативные результаты иммуноблоттинга лизатов МСКМ, МСКД и МСКЖТ, полученных до начала эксперимента (дорожка «0») и через 96 часов культивирования с добавлением БСА (дорожка «-/96») или ТФР-β1 (дорожка «+/96»). **Б.** Денситометрический анализ результатов иммуноблоттинга. Для контроля загрузки использовали уровень ГАФД, а для нормировки между донорами – уровень исследуемого белка в начале эксперимента. При статистическом анализе log-трансформированных данных применен t-критерий для зависимых выборок; $n=3$, * $p<0,05$. **В.** Иммунофлуоресцентное мечение α-ГМА в МСКМ, МСКД и МСКЖТ, культивированных с добавлением БСА или ТФР-β1. **Г.** Иммунофлуоресцентное мечение винкулина в МСКМ, МСКД и МСКЖТ, культивированных с добавлением БСА или ТФР-β1. **Д.** Характерное для миофибробластов взаимное расположение α-ГМА и винкулина в культурах МСКМ, МСКД и МСКЖТ. Масштабный отрезок 100 мкм; ядра помечены DAPI.

Функциональность приобретаемого сократительного фенотипа оценивали в модели контракции флотирующего диска из свиного коллагена с заключенными в нём клетками. Оказалось, что все исследованные МСК сократировали коллагеновый диск без добавления ТФР-β1, при этом для

МСКМ было отмечено наибольшее сокращение площади диска. Значимое усиление контракции под влиянием ТФР-β1 было обнаружено только для МСКД (рис. 6). Это согласовывалось с результатами оценки сократительного фенотипа методом иммунофлуоресценции, где только у МСКД практически отсутствовали α-ГМА-положительные стресс-фибриллы в контрольных образцах (рис. 5, В).

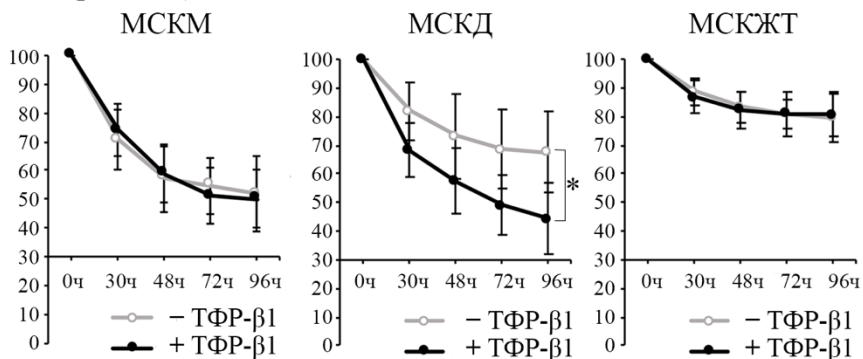


Рисунок 6. Сравнение динамики контракции коллагеновых дисков МСКМ, МСКД и МСКЖТ под действием БСА или ТФР-β1. При статистическом анализе использовали t-критерий для зависимых выборок; n=3, *p<0,05.

Резюмируя полученные результаты, можно утверждать, что МСКМ способны совершать фенотипический переход в миофибробласты *in vitro* сопоставимо с МСКД и МСКЖТ. Вместе с тем, известно, что устойчивость клеток стромы эндометрия к данному переходу *in vivo* очень высока (van Kaam et al., 2008; Liu et al., 2013; Li et al., 2016). Следовательно, это может быть обусловлено регуляторным действием растворимых факторов, образуемых в эндометрии в ходе его восстановления.

Исследование действия растворимых факторов, образуемых в эндометрии в ходе менструации, в отношении фиброплазии и фенотипического перехода МСК в миофибробласты *in vitro*. Для решения поставленной задачи мы сравнивали действие СМО, содержащей как локально продуцируемые в эндометрии факторы, так и системные гуморальные стимулы, и СПК, содержащей только системные гуморальные стимулы, на культуры МСКМ, МСКД и МСКЖТ. Полученная разница в результатах рассматривалась как эффект растворимых факторов, образуемых в эндометрии во время менструации (РФМ).

Перед началом экспериментов мы измерили методом ИФА содержание ТФР-β1 в растворах используемых сывороток. Концентрация ТФР-β1 в 10% СМО составила $9,3 \pm 0,57$ нг/мл, а в 10% СПК равнялась $4,9 \pm 0,15$ нг/мл (рис. 7, Г), что было сопоставимо с количеством

рекомбинантного ТФР- β 1 (10 нг/мл), использованным в предыдущих экспериментах по индукции фенотипического перехода МСК в миофибробласты.

Оценка действия РФМ в отношении приобретения контрактильного фенотипа МСК. Методом иммуноблоттинга мы обнаружили значимое снижение уровня α -ГМА под действием РФМ во всех исследуемых культурах (рис. 7, А, Б). Уровень винкулина также снижался в МСКМ и МСКЖТ, но не в МСКД.

При иммунофлуоресцентном анализе мы визуально обнаруживали во всех обработанных СМО культурах МСК лишь единичные клетки, содержащие α -ГМА-позитивные стресс-фибриллы, в то время как при культивировании в присутствии СПК они встречались чаще. Кроме того, под действием РФМ кластеры винкулина становились менее выраженными (рис. 7, В).

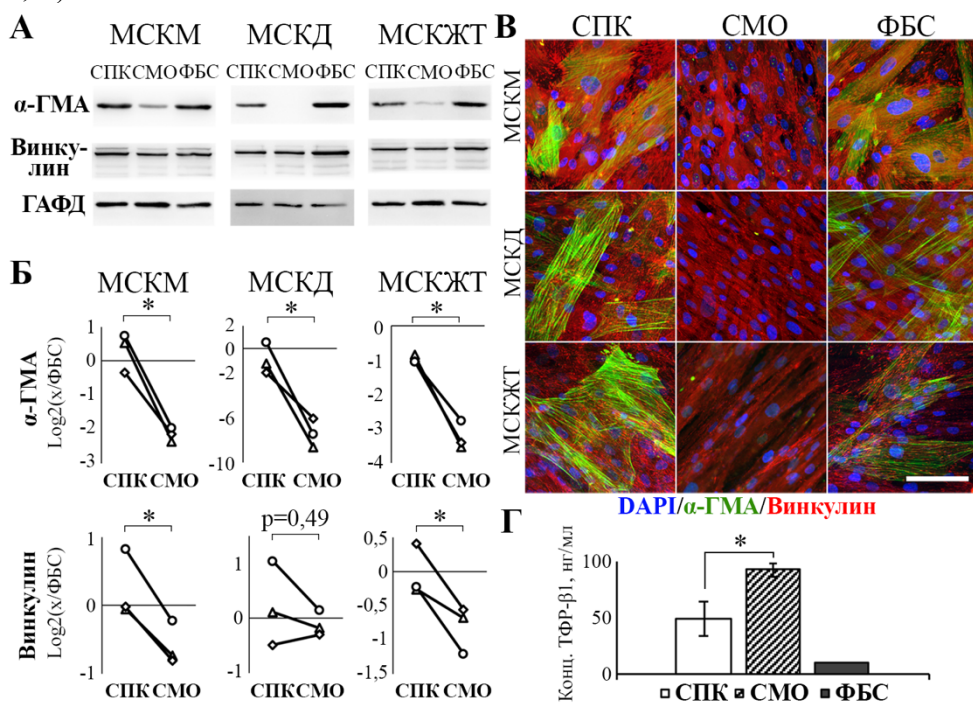


Рисунок 7. РФМ подавляют приобретение контрактильного фенотипа МСКМ, МСКД и МСКЖТ. **А.** Репрезентативные результаты иммуноблоттинга тотальных лизатов, полученных через 96 часов культивирования исследуемых МСК с 10% СПК, СМО или ФБС. **Б.** Денситометрический анализ результатов иммуноблоттинга. Для контроля загрузки использовали уровень ГАФД, а для нормировки между донорами – уровень исследуемого белка, содержащийся в клетках после

культивирования с 10% ФБС. При статистическом анализе log-трансформированных данных применен t-критерий для зависимых выборок; $n=3$, * $p<0,05$. **В.** Иммунофлуоресцентное мечение α -ГМА и винкулина в МСК через 96 часов культивирования с 10% СПК, СМО или ФБС; масштабный отрезок 100 мкм; ядра помечены DAPI. **Г.** Концентрация ТФР- $\beta 1$ в СМО, СПК и ФБС, определенная методом ИФА. Для статистического анализа данных использован критерий Манна-Уитни; $n=3$, * $p<0,05$.

Оценка влияния РФМ на продукцию белков ВКМ в культурах МСКМ, МСКД и МСКЖТ. Методом иммуноблоттинга мы обнаружили индуцированное РФМ значимое снижение содержания коллагена I типа (молекулярная масса ≈ 130 кДа) в культурах МСКМ и МСКЖТ (рис. 8, А, Б). В культурах МСКД была выявлена сходная тенденция. Параллельно нам удалось обнаружить небольшое, но статистически значимое снижение уровня ДД-А фибронектина в культурах МСКЖТ, в то время как в культурах МСКМ и МСКД также наблюдалась похожая, но еще менее выраженная тенденция.

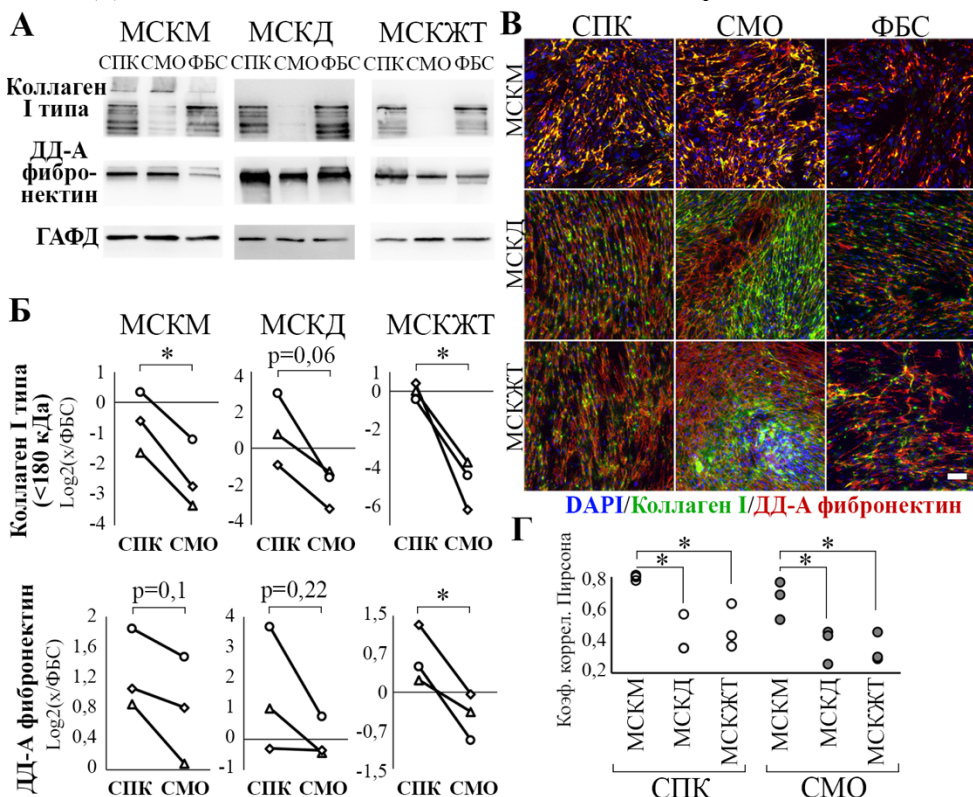


Рисунок 8. Влияние РФМ на содержание и депонирование коллагена I типа и ДД-А фибронектина в культурах МСКМ, МСКД и МСКЖТ. А.

Репрезентативные результаты иммуноблоттинга тотальных лизатов, полученных через 96 часов культивирования МСК с 10% СПК, СМО или ФБС. **Б.** Денситометрический анализ результатов иммуноблоттинга. Для контроля загрузки использовали уровень ГАФД, а для нормировки между донорами – уровень исследуемого белка, содержащийся в клетках после культивирования с 10% ФБС. При статистическом анализе log-трансформированных данных применен t-критерий для зависимых выборок; $n=3$, * $p<0,05$. **В.** Иммунофлуоресцентное мечение локализованных вне клеток коллагена I типа и ДД-А фибронектина в МСКМ, МСКД и МСКЖТ через 96 часов культивирования с 10% СПК, СМО или ФБС. Масштабный отрезок 100 мкм. Ядра помечены DAPI. **Г.** Колокализация коллагена I типа и ДД-А фибронектина по данным флуоресцентной микроскопии через 96 часов культивирования МСКМ, МСКД и МСКЖТ в присутствии 10% СПК или СМО. Точками на графике представлены значения коэффициента корреляции Пирсона; для статистического анализа данных были использованы однофакторный дисперсионный анализ и критерий Ньюмена-Кеулса; $n=3$, * $p<0,05$.

Депонирование коллагена I типа и ВД-А фибронектина во внеклеточном пространстве оценивали путем иммунофлуоресцентного мечения без пермеабилзации клеток, что позволило при микроскопии получить специфический сигнал именно от внеклеточно локализованных белков. Мы обнаружили выраженное депонирование коллагена I типа под действием как СМО, так и СПК (рис. 8, В). Это не совпадало с результатами иммуноблоттинга, однако, в отличие от иммунофлуоресцентного мечения, при иммуноблоттинге мы оценивали общее количество коллагена I типа, локализованного как вне-, так и внутриклеточно. Таким образом, во всех исследуемых культурах РФМ не подавляли депонирование коллагена I типа, которое мы обнаруживали методом иммунофлуоресценции, но снижали интенсивность его продукции клетками, обнаруживаемую нами методом иммуноблоттинга.

Колокализация коллагена I типа и ДД-А фибронектина под действием РФМ оставалась значимо выше в культурах МСКМ, чем в культурах МСКД и МСКЖТ (рис. 8, Г), что хорошо согласовывалось с полученными ранее результатами при оценке способности исследуемых клеток к фенотипическому переходу в миофибробласты (рис. 4, Г) и указывало на высокую стабильность данного свойства МСКМ. Вероятно, это может иметь отношение к устойчивости МСКМ к фиброплазии, однако данная гипотеза требует отдельной проверки.

Вместе с тем, только в обработанных СМО культурах МСКД и МСКЖТ, но не МСКМ, мы обнаружили неравномерное распределение коллагена I типа, характеризующееся образованием зон его скопления и

разрежения (рис. 8, В). Зоны скопления совпадали с участками высокой плотности клеток, которые очень походили на участки клеточного пласта. Подобные структуры образуются при моделировании фиброплазии *in vitro* и часто называются «холмами» (англ. «hills»). Методом конфокальной микроскопии мы подтвердили наличие «холмов» в зонах скопления клеток (рис. 9, А). Поскольку данный феномен изначально обратил на себя внимание за счет неравномерного распределением коллагена I типа, была проведена дополнительная оценка его колокализации с ДД-А фибронектином по высоте (ось Z). Мы обнаружили, что ДД-А фибронектин располагался выше, чем коллаген I типа в культурах МСКД и МСКЖТ, но не МСКМ (рис. 9, Б, В).

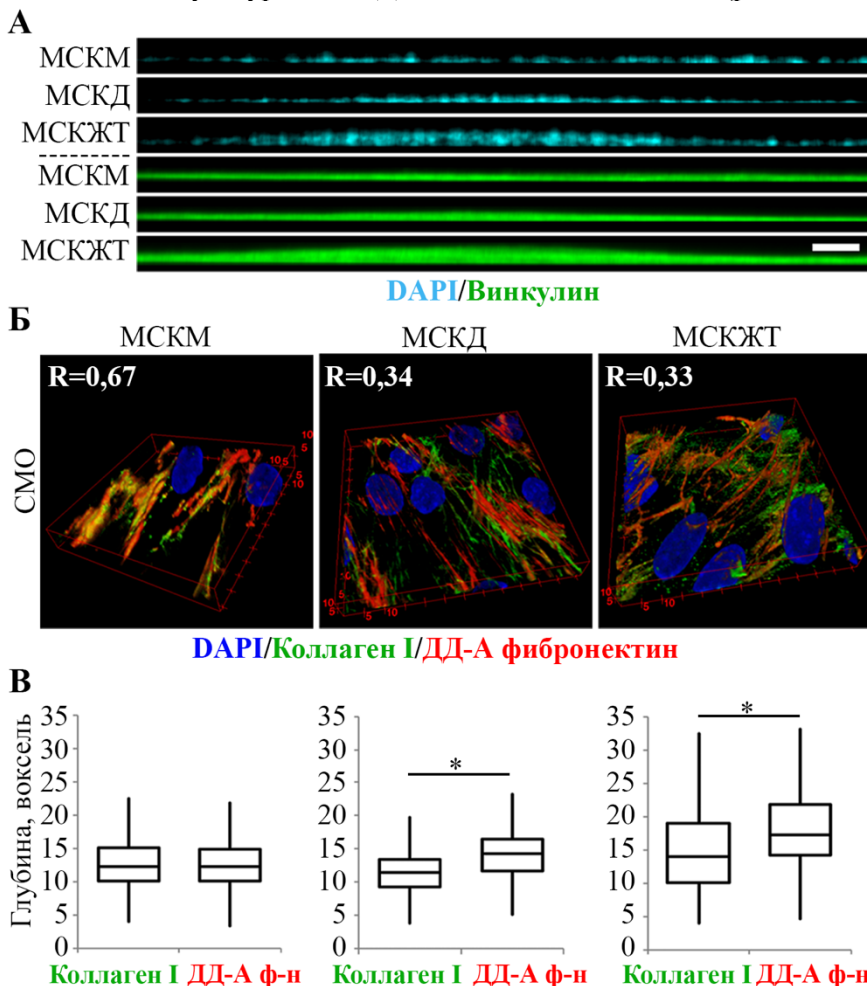


Рисунок 9. Влияние СМО на организацию клеток и белков ВКМ в культурах МСКМ, МСКД и МСКЖТ. **А.** «Холмы» в культурах МСКД и МСКЖТ, но не МСКМ. Конфокальная микроскопия, боковая проекция,

масштабный отрезок 50 мкм. **Б.** Колокализация коллагена I типа и ДД-А фибронектина по данным конфокальной микроскопии. 3D-реконструкция. R – коэффициент корреляции Пирсона. **В.** Уровни локализации внеклеточных коллагена I типа и ДД-А фибронектина по высоте.

Таким образом, РФМ подавляли фенотипический переход всех исследуемых МСК в миофибробласты, и вместе с тем индуцировали фиброплазию только в способных к ней культурах МСКД и МСКЖТ.

Заключение

В ходе выполнения данной работы мы обнаружили, что МСКМ *in vitro* обладают устойчивостью к фиброплазии, но не фенотипическому переходу в миофибробласты, а образуемые в эндометрии в ходе менструации растворимые факторы, напротив, способны подавлять фенотипический переход МСК в миофибробласты, но не фиброплазию.

Резюмируя полученные результаты в контексте имеющихся представлений о механизмах восстановления эндометрия в ходе менструации, можно сформулировать наиболее вероятные причины, по которым данный процесс не сопровождается формированием рубцовой ткани или развитием фиброза.

Во-первых, клетки стромы эндометрия не предрасположены к фиброплазии, что не позволяет образовываться большому объему молодой соединительной ткани на оголенной поверхности базального слоя. Если бы эта ткань формировалась, она бы затем могла трансформироваться в рубцовую, как это происходит, например, при заживлении кожной раны.

Во-вторых, в составе находящегося в полости матки менструального отделяемого присутствуют факторы, подавляющие фенотипический переход клеток стромы базального слоя в миофибробласты, в результате чего соединительная ткань не подвергается фиброзированию. Быстро происходящие затем в ней ангиогенез и на ней эпителизация способствуют полному восстановлению нормальной структуры, в которой уже отсутствуют предпосылки для фиброзирования и рубцевания эндометрия, критически важного для реализации репродуктивной функции.

Выводы

1. Культуры мезенхимальных стромальных клеток, выделенные из менструального отделяемого, дермы и жировой ткани, соответствуют минимальным критериям международного общества клеточной терапии, что позволяет отнести их к одному клеточному типу.

2. Мезенхимальные стромальные клетки менструального отделяемого обладают сопоставимой с мезенхимальными стромальными клетками дермы и жировой ткани способностью совершать фенотипический переход в миофибробласты, но проявляют тканеспецифичную устойчивость к фиброплазии *in vitro*.

3. Мезенхимальные стромальные клетки менструального отделяемого, в сравнении с мезенхимальными стромальными клетками дермы и жировой ткани, обнаруживают *in vitro* устойчивую тканеспецифичную особенность взаимного расположения находящихся во внеклеточном пространстве коллагена I типа и ДД-А фибронектина, заключающуюся в большей степени колокализации данных матриксных белков.

4. Растворимые факторы, образуемые при восстановлении эндометрия в ходе менструации, противодействуют фенотипическому переходу мезенхимальных стромальных клеток менструального отделяемого, дермы и жировой ткани в миофибробласты *in vitro*.

5. Растворимые факторы, образуемые при восстановлении эндометрия в ходе менструации, способствуют фиброплазии в способных к ней культурах мезенхимальных стромальных клеток дермы и жировой ткани, но не в культурах мезенхимальных стромальных клеток менструального отделяемого.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, PИИЦ:

1. **Eremichev R.**, Kulebyakina M., Alexandrushkina N., Nimiritsky P., Basalova N., Grigorieva O., Egiazaryan M., Dyikanov D., Tkachuk V., Makarevich P. Scar-Free Healing of Endometrium: Tissue-Specific Program of Stromal Cells and Its Induction by Soluble Factors Produced After Damage // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Т. 9, № 212. (IF=6.684, WoS, Scopus, Q1)
2. Nimiritsky P., **Eremichev R.**, Alexandrushkina N., Efimenko A., Tkachuk V., Makarevich P. Unveiling Mesenchymal Stromal Cells' Organizing Function in Regeneration // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Т. 20, № 4. – С. 823. (IF=5.923, WoS, Scopus, Q1)
3. **Еремичев Р.**, Григорьева О., Кулебякин К., Ефименко А., Макаревич П. Растворимые факторы, образуемые при заживлении эндометрия, подавляют его "фиброзирование" *in vitro* // *Гены и клетки*. – 2018. – Т. 13, № 2. (IF=0.914, RSCI, Scopus)
4. **Еремичев Р.**, Макаревич О., Александровская Н., Кулебякин К., Дыйканов Д., Макаревич П. Сыворотка менструальной крови оказывает противофиброзное действие на мезенхимные стромальные клетки эндометрия человека // *Цитология*. – 2018. – Т. 60, № 2. – С. 96-103. (IF=0.667, RSCI, Scopus)

Тезисы докладов на конференциях и статьи в сборниках:

1. Alexandrushkina N., Grigorieva O., **Eremichev R.**, Makarevich P. Tissue-specific interaction of stromal cells and endothelium *in vitro* leads to a distinct pattern of angiogenic response // *HUMAN GENE THERAPY*. – Т. 30 –MARY ANN LIEBERT, INC 140 HUGUENOT STREET, 3RD FL, NEW ROCHELLE, NY 10801 USA, 2019. – С. A215-A215.

2. **Eremichev R.**, Grigorieva O., Alexandrushkina N., Kulebyakin K., Dyikanov D., Makarevich P. Antifibrotic environment of stromal cells drives scar-free healing of human endometrium during menstruation // HUMAN GENE THERAPY. – Т. 29 –MARY ANN LIEBERT, INC 140 HUGUENOT STREET, 3RD FL, NEW ROCHELLE, NY 10801 USA, 2018. – С. A146-A146.
3. **Еремичев Р.**, Кулебякина М., Нимирицкий П., Егиазарян М., Александрушкина Н., Макаревич П. Изменение стромальных клеток под действием менструальной жидкости в контексте заживления эндометрия // Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14, № 5. – С. 89-89.
4. **Еремичев Р.**, Макаревич О., Кулебякин К., Александрушкина Н., Макаревич П. Изменения морфологии мезенхимных стромальных клеток эндометрия при моделировании регенеративных процессов invitro // Гены и Клетки. – 2017. – Т. 12, № 3. – С. 92-93.

Список сокращений

БСА – бычий сывороточный альбумин
 ВКМ – внеклеточный матрикс
 ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
 ДД-А – дополнительный домен А
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
 ИФА – иммуноферментный анализ
 МСК – мезенхимальные стромальные клетки
 МСКД – мезенхимальные стромальные клетки дермы
 МСКМ – мезенхимальные стромальные клетки менструального отделяемого
 МСКЖТ – мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани
 ПВДФ – поливинилиденфторид
 РФМ – растворимые факторы, образуемые в эндометрии в ходе менструации
 СМО – сыворотка менструального отделяемого
 СПК – сыворотка периферической крови
 ТФР-β1 – трансформирующий фактор роста β1
 ФБС – фетальная бычья сыворотка
 ФСБ – фосфатно-солевой буфер
 CD – cluster of differentiation
 DMEM – dulbecco's modified eagle medium
 DMEM/F12 - dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture f-12
 DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол
 ISCT – международное общество клеточной терапии
 pSMAD2 – фосфорилированный SMAD2
 SMAD2 – similar to mothers against decapentaplegic 2
 α-ГМА – α-гладкомышечный актин