

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

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

Диссертация на соискание
учёной степени кандидата
медицинских наук

Научный руководитель

к.м.н. П.И. Макаревич

Москва, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Строение эндометрия.....	11
1.2 Обновление эндометрия в менструальном цикле	11
1.3 Механизмы отторжения функционального слоя и восстановления эндометрия в перименструальном периоде.....	13
1.3.1 Падение уровня прогестерона в поздней секреторной фазе вызывает начало менструации.....	13
1.3.2 Массовая гибель клеток и развитие воспаления в эндометрии предшествуют началу менструации.....	15
1.3.3 Десквамация функционального слоя и безрубцовое восстановление эндометрия.....	18
1.4 Мезенхимальные стромальные клетки как объект исследования.....	23
1.5 МСК подходят для моделирования фиброплазии и фенотипического перехода в миофибробласты <i>in vitro</i>	27
1.6 МСК, выделяемые из менструального отделяемого, подходят для <i>in vitro</i> моделирования процессов, связанных с восстановлением эндометрия	30
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
2.1. Общая схема экспериментального исследования.....	33
2.2. Получение объектов исследования	34
2.3. Оценка соответствия выделенных культур минимальным критериям МСК...	42
2.4. Оценка способности МСК к фиброплазии в стандартных условиях культивирования	46
2.5 Оценка способности МСК к индуцируемому ТФР- β 1 фенотипическому переходу в миофибробласты.....	47

2.6 Оценка способности МСК к контракции.....	47
2.7 Оценка концентрации ТФР-β1 в исследуемых образцах сывороток.....	48
2.8 Оценка действия растворимых факторов, образуемых при восстановлении эндометрия в ходе менструации, на МСК в отношении фиброплазии и фенотипического перехода в миофибробласты.....	48
2.9 Определение в полученных клеточных лизатах уровня белков-маркеров миофибробластов и степени активации SMAD-зависимого сигнального пути методом иммуноблоттинга.....	49
2.10 Оценка белков-маркеров миофибробластов методом иммунофлуоресцентного анализа.....	49
2.11 Статистический анализ данных.....	50
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	52
3.1. Оценка соответствия культур МСК менструального отделяемого, дермы и жировой ткани минимальным критериям ISCT.....	52
3.2. Исследование способности МСКМ, МСКД и МСКЖТ к фиброплазии и фенотипическому переходу в миофибробласты <i>in vitro</i>	57
3.3. Исследование действия растворимых факторов, образующихся в эндометрии в ходе менструации, в отношении фиброплазии и фенотипического перехода МСК в миофибробласты <i>in vitro</i>	70
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	87
ВЫВОДЫ.....	88
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	90

ВВЕДЕНИЕ

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 [1, 2]. Фиброз или формирование рубца в толще органа устойчиво изменяет его структуру, значительно ограничивая эндогенные и терапевтические возможности восстановления функции [3, 4]. 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. При этом всегда присутствовало желание изобрести способы такого восстановления, что создавало мотивацию для изучения механизмов заживления и регенерации [5]. «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. [6]. Попытки ответа на него дали целый пласт важнейших научных результатов, убедительно показавших, 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 [7]. 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 означает, 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 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 [8, 9]. 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 [10-13].

Первыми исследователями, подробно описавшими на гистологическом уровне процессы, происходящие в эндометрии человека в ходе менструации, были E. Novak и R.W. Te Linde [14]. J.E. Markee создал модель трансплантации эндометрия в переднюю камеру глаза макака-резус, позволившую наблюдать события в динамике при малом увеличении [15]. H. Ludwig и A. Ferenczy расширили имевшийся объем знаний при помощи электронной микроскопии, а R. Garry с коллегами составили подробную гистероскопическую картину событий при менструации [16-18]. Результатом работ перечисленных и ряда других авторов стало установление высокой степени разрушения тканей эндометрия в ходе менструации, а также признание факта развития в нём воспаления. 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 [19]. 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. Gaide Chevronnay, J. Evans, F. L. Cousins и рядом других ученых, позволили выявить процессы, а также отдельные факторы, влияющие на скорость и степень восстановления эндометрия, но причины, по которым не происходит образования рубца, так и не были определены. Их выяснение 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 фиброзирование, 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 [20-22]. Моделирование данных процессов *in vitro* оказалось возможным с использованием мезенхимальных стромальных клеток, культуры которых выделяются 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, несмотря на достаточное количество предрасполагающих факторов [10]. Параллельно развитие регенеративной медицины способствовало проведению множества сравнительных исследований мезенхимальных стромальных клеток из различных источников, показавших наличие у них автономных (сохраняющихся *in vitro*) тканеспецифичных свойств [23].

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, образуемых 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 жировой ткани и дермы 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 содержащего дополнительный домен A (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. 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. Ломаносова.

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 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

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Строение эндометрия

Эндометрий – покрывающая полость матки слизистая оболочка, состоящая из стромы, представленной собственной пластинкой, и однослойного призматического эпителия, который по принципу локализации принято разделять на два типа: покровный эпителий полости матки и эпителий желез.

Собственная пластинка эндометрия состоит из формируемой фибробластами и матриксными белками рыхлой волокнистой соединительной ткани, содержащей в себе также сосуды, нервные окончания и иммунокомпетентные клетки (натуральные киллеры, дендритные клетки, тканевые макрофаги, тучные клетки и некоторое количество лейкоцитов) [24]. Важно отметить, что, несмотря на расположение всех перечисленных объектов в строме, собственно к стромальным относят только фибробластоподобные клетки со всем возможным многообразием их подтипов (фибробласты, перициты, адвентициальные клетки и др.).

В эндометрии принято выделять два слоя: функциональный и базальный, причем функциональный слой отторгается в ходе каждой менструации, а базальный сохраняется в течение всей жизни. С этим связаны особенности кровоснабжения, которое осуществляется посредством радиальных артерий, являющихся ветвями аркуатных артерий миометрия. В базальном слое радиальные артерии отдают ветви: прямые и спиральные артерии [25]. Прямые артерии не покидают базального слоя, в то время как спиральные следуют в функциональный слой [26]. Иннервация эндометрия осуществляется симпатическими и парасимпатическими нервными волокнами, а также первичными афферентами [27, 28].

1.2 Обновление эндометрия в менструальном цикле

Обновление эндометрия происходит уникальным, в сравнении со всеми другими тканями организма, образом: в ходе каждого менструального цикла, в ответ на изменения системного уровня половых стероидных гормонов, функциональный слой отторгается, а затем заново вырастает из базального слоя.

Менструальный цикл принято делить на фазы. Первой является *фаза менструации*, также называемая фазой десквамации, перед наступлением которой толщина эндометрия может достигать 10-14 мм. Начало *фазы менструации* обнаруживает себя кровянистыми выделениями из половых путей, представляющими собой смесь крови и отторгаемых тканей функционального слоя эндометрия, составляющего к тому моменту до 70-90% объема слизистой. Сразу после отторжения функционального слоя начинается быстрое восстановление целостности эндометрия, которое полностью завершается к 5-6 суткам, т.е. через 1-2 суток после прекращения кровянистых выделений.

Затем следует *фаза пролиферации*, в начале которой эндометрий сохраняется в пределах базального слоя, а его толщина не превышает 3 мм. В течение последующих 10 дней толщина эндометрия может увеличиться в 3-4 раза. В этот период утолщение преимущественно происходит за счет увеличения объема стромы, сопровождаемого ростом сосудов и нервов, а также за счет удлинения желез [26, 29]. Продуцируемые яичниками эстрогены являются основным индуктором роста эндометрия, рецепторы к этим гормонам экспрессируют в фазе пролиферации различные клетки в строме (фибробласты, перициты, эндотелиоциты, гладкомышечные клетки), а также эпителиоциты [30].

Приблизительно к 14 дню менструального цикла происходит овуляция, которая приводит к значительному снижению продукции эстрогенов и образованию желтого тела, начинающего выделять большое количество гестагенов. Сразу после овуляции начинается *секреторная фаза*, в ходе которой гестагены (главным образом прогестерон) вызывают изменения структуры эндометрия, необходимые для его подготовки к имплантации. С 19-20 дня железы становятся извитыми, их клетки начинают накапливать в цитоплазме гранулы гликогена и выделять богатый гликопротеинами секрет в просвет желез и полость матки. С 20-22 дня развивается отек стромы, сопровождаемый закручиванием спиральных артерий, приобретающих еще более спиралевидную форму. В это же время начинается децидуализация стромальных клеток, которая, однако, становится морфологически выраженной только к 24-26 дням секреторной фазы.

Сначала децидуализируются клетки вблизи спиральных артерий, а затем – расположенные под поверхностным эпителием [29]. В ходе децидуализации клетки изменяют фенотип с фибробластоподобного на эпителиоподобный, накапливают в цитоплазме матриксные белки (коллагены, ламинины и др.) и начинают секретировать повышенное количество пролактина, IGFBP1 и ряда других молекул [31]. В ходе децидуализации открывается окно имплантации. В случае, если беременность не наступает, желтое тело в яичнике подвергается регрессии, системный уровень половых стероидных гормонов падает, и через несколько дней снова наступает фаза менструации – таким образом цикл замыкается.

Наиболее необычным этапом менструального цикла является фаза менструации, в ходе которой сначала происходит масштабное, сопровождаемое кровотечением, разрушение структурной целостности эндометрия, а затем быстрое и полное её восстановление без каких-либо неблагоприятных последствий. Ничего подобного не происходит при обновлении (физиологической регенерации) прочих структур организма человека. Разрушение органа или его части, как правило, сопровождается действием *внешних причин*, и речь в таких случаях идёт о репаративной, то есть происходящей в ответ на повреждение, регенерации.

Если принять очевидный факт, что, как минимум в случае эндометрия, повреждение может быть вызвано *внутренними причинами*, то регенерацию его функционального слоя следует классифицировать как репаративную или, возможно, как уникальный случай физиологической, идущей по принципам репаративной. В подтверждение данного тезиса ниже подробно описаны процессы, идущие в перименструальном периоде.

1.3 Механизмы отторжения функционального слоя и восстановления эндометрия в перименструальном периоде

1.3.1 Падение уровня прогестерона в поздней секреторной фазе вызывает начало менструации

Общепризнано, что основной причиной запуска менструации является падение уровня прогестерона в крови в результате регрессии желтого тела в

яичнике [10]. Экспериментально данное положение было подтверждено в работе О. D. Slayden и R. M. Brenner [32]: на макаках, которым предварительно удаляли яичники, авторы моделировали 28-дневный менструальный цикл при помощи подкожного введения имплантов, выделяющих в течение длительного времени половые стероидные гормоны. Сразу после овариэктомии животным вводили имплант с эстрадиолом, который оставался в тканях до конца эксперимента. Через 14 суток для моделирования секреторной фазы вводили имплант с прогестероном, который удаляли также через 14 суток, для индукции менструации. Кровотечение с последующей десквамацией функционального слоя эндометрия начиналось на 2 сутки после отмены прогестерона. В случае, если в течение 24 часов после отмены имплант с прогестероном возвращали в ткани, менструация не наступала. Таким образом, в данной работе было однозначно подтверждено наличие причинно-следственной связи между падением уровня прогестерона и наступлением менструации. На релевантность этой связи для организма человека указывает возможность применения для индукции менструации антигестагенов, что было показано в клинических испытаниях мифепристона, блокирующего связывание прогестерона с его рецепторами [33]. Здоровые женщины в возрасте от 26 до 45 лет принимали 200 мг мифепристона на 8 сутки секреторной фазы, после чего через 36-48 часов начиналось менструальноподобное кровотечение, которое длилось 12-72 часа. Следующая менструация у большинства участниц исследования наступала в срок.

Важно акцентировать внимание на том, что даже между резким падением уровня прогестерона в экспериментальных условиях и началом менструации проходит 36-48 часов. Очевидно, что при более плавном снижении его уровня в нормальном менструальном цикле этот интервал должен быть продолжительнее. В свою очередь непосредственный рецепторный ответ компетентных клеток на прогестерон или его отмену занимает гораздо меньшее время.

Следовательно, во временной промежуток между падением уровня прогестерона и началом десквамации функционального слоя должен происходить целый ряд последовательных событий, запускаемых различными, вторично

продуцируемыми сигнальными молекулами. К данным событиям помимо прочего относятся массовая гибель клеток и развитие воспаления. Ниже обобщены результаты работ, подтверждающих данную точку зрения.

1.3.2 Массовая гибель клеток и развитие воспаления в эндометрии предшествуют началу менструации

Сенсорами падения уровня прогестерона в функциональном слое эндометрия в поздней секреторной фазе главным образом являются децидуальные клетки, поскольку на данном этапе менструального цикла преимущественно именно они экспрессируют соответствующие рецепторы. Ни иммунокомпетентные клетки, ни клетки спиральных артерий не экспрессируют рецепторы прогестерона в эндометрии, а среди эпителиальных клеток желез к концу менструального цикла положительными по данным рецепторам остаются не более 20% [34].

В секреторной фазе прогестерон ингибирует в децидуальных клетках продукцию провоспалительных цитокинов, матриксных металлопротеиназ (ММП), эндотелина-1, активаторов плазминогена, одновременно усиливая экспрессию ингибиторов протеаз [35]. В целом, это приводит к повышению порога чувствительности к повреждению эндометрия, которое в дальнейшем может происходить при имплантации бластоцисты в случае наступления беременности. Именно эта «предохранительная» активность прогестерона является одной из основных причин его использования в клинической практике для предотвращения выкидышей [36]. Механизм запуска такого противовоспалительного действия до конца не изучен, однако в исследованиях *in vitro* было показано, что рецепторы прогестерона и NF-κB взаимно подавляют транскрипционную активность друг друга [37, 38]. NF-κB – это фактор транскрипции, стимулирующий экспрессию генов провоспалительных цитокинов, в т.ч. в ответ на повреждение тканей [39].

Падение уровня прогестерона перед менструацией приводит к значительному снижению экспрессии поддерживаемых им генов и повышению экспрессии подавляемых, в результате чего снижается порог чувствительности эндометрия к повреждению. Активация NF-κB, следующая за падением уровня прогестерона, была показана *in vitro* на культуре стромальных клеток эндометрия

человека, а также *in vivo* в мышинной модели менструации [40, 41]. При этом ингибирование активации NF-κB приводило к значительному подавлению десквамации функционального слоя. Таким образом, активация NF-κB – не только признак развития воспаления в эндометрии, но и значимое звено механизма его десквамации.

В этом же временном промежутке (поздней секреторной фазе) происходит массовый апоптоз клеток эпителия желёз, который ближе к началу менструации дополняется апоптозом меньшего количества клеток стромы. Данный факт был установлен путем иммуногистохимической визуализации активированной каспазы-3 на срезах биоптатов эндометрия, полученных от женщин в перименструальном периоде, а также от мышей, на которых моделировали менструацию [42]. При аналогичном анализе распределения NLRP3 и ASC (основных компонентов инфламмосомы) в эндометрии было обнаружено значительное увеличение их содержания в децидуализированной строме, окружающей спиральные артерии [43]. Вместе с активацией NF-κB это свидетельствует о подверженности находящихся там клеток *пироптозу* – типу клеточной гибели, реализуемому, как правило, на первых этапах воспаления и сопровождаемому выделением из умирающих клеток большого количества провоспалительных цитокинов (ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-18, ИЛ-8, интерферон-I и др.) [39, 44]. При этом непосредственные причины, вызывающие гибель клеток, остаются неизвестными.

Первым макроскопическим изменением, происходящим в эндометрии на фоне падения уровня прогестерона, является уменьшение объема тканей. Ученым, впервые наблюдавшим за данным процессом *in vivo*, а также подробно его описавшим, назвав *регрессией*, был J.E. Markee. Он разработал способ трансплантации эндометрия в переднюю камеру глаза макака-резус, после чего наблюдал за изменениями трансплантата на фоне естественного менструального цикла, а также в различных экспериментальных условиях [15]. Автор также описал следующий после регрессии период стаза, после которого наступал период выраженной и длительной вазоконстрикции (за 4-24 ч до начала менструации),

завершающийся появлением первых признаков кровотечения [45]. Наиболее вероятными эффекторными молекулами, вызывающими длительное сокращение сосудов эндометрия, являются простагландины, вазоактивность которых хорошо известна [46]. В мышинной модели менструации *in vivo*, а также *in vitro* на культуре стромальных клеток эндометрия было обнаружено, что вслед за активацией NF-κB происходит значительное повышение экспрессии циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) – индуцибельного фермента, осуществляющего превращение арахидоновой кислоты в простаноиды. Ингибирование ЦОГ-2 приводило к подавлению десквамации функционального слоя [41], следовательно, простаноиды – не только вероятные медиаторы вазоконстрикции, но и неотъемлемое звено механизма десквамации эндометрия.

Активация синтеза провоспалительных цитокинов и простаноидов и стаз крови в сосудах являются общеизвестными этапами развития воспаления, за которыми должна последовать миграция в ткани нейтрофилов и моноцитов, что и происходит перед десквамацией функционального слоя.

Непосредственно перед началом менструации ткани эндометрия инфильтрируют нейтрофилы. В первый день их доля среди всех клеток достигает максимума (до 10%). Это было показано при иммуногистохимическом мечении эластазы нейтрофилов на срезах образцов эндометрия человека (после гистерэктомий, проведенных в перименструальном периоде), а также образцов эндометрия, полученных на мышинной модели менструации [42]. Параллельно методом ПЦР в реальном времени авторы продемонстрировали повышение уровня экспрессии провоспалительных цитокинов в эндометрии, что указывало на усиление воспалительного ответа с приходом нейтрофилов.

Миграция моноцитов также становится достаточно выраженной с началом десквамации функционального слоя. Это было обнаружено при моделировании менструации у трансгенных мышей, экспрессирующих усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP) в моноцитах [47]. Авторы показали, что большая часть флуоресцирующих клеток скапливалась в зоне, отделяющей базальный слой от функционального.

Таким образом, можно заключить, что к началу менструации в эндометрии развивается острое воспаление, которое доходит до стадии инфильтрации лейкоцитами. В контексте классических представлений о воспалительном ответе тканей на повреждение это соответствует 24-48 часам после его начала [44]. Приблизительно столько же времени проходит после массовой гибели клеток эндометрия на фоне падения уровня прогестерона. Следующим этапом после развития воспаления становится десквамация функционального слоя.

1.3.3 Десквамация функционального слоя и безрубцовое восстановление эндометрия

Непосредственной причиной десквамации функционального слоя является протеолитическое расщепление белков внеклеточного матрикса (ВКМ). Важная роль именно ММП в данном процессе экспериментально была показана при моделировании десквамации эндометрия *ex vivo* в эксплантах биоптатов эндометрия человека, которую вызывали депривацией эстрадиола и прогестерона в культуральной среде [48]. Авторы тестировали возможность подавления протеолиза ингибиторами различных протеаз, но соответствующий эффект оказывали только ингибиторы ММП. При моделировании менструального цикла на макаках было показано возрастание уровня экспрессии ММП непосредственно перед началом менструации [32]. Зимографическое исследование биоптатов эндометрия человека, полученных на разных этапах менструального цикла, в том числе в перименструальном периоде, показало, что активность ММП в эндометрии носит фокальный характер и значительно возрастает именно в фазе менструации, в то время как иммуногистохимическое мечение ММП давало более равномерное распределение сигнала в перименструальном периоде [49]. Вместе с тем, было показано, что в некоторых фокусах ферментативная активность колокализовалась с положительными по CD45 клетками. На основе этих данных была сформулирована гипотеза об участии лейкоцитов в активации ММП [50]. Частичное её экспериментальное подтверждение было произведено на мышинной модели менструации. Авторы показали, что при подавлении системного уровня нейтрофилов специфическими антителами, замедлялись процессы как

десквамации, так и восстановления эндометрия [51]. По-видимому, нейтрофилы, попадая в эндометрии под действие медиаторов воспаления, соответствующим образом праймируются. Затем они вызывают реакцию подобную вторичной альтерации, которая обычно происходит при миграции нейтрофилов в зону повреждения и аналогичным образом сопровождается продукцией нейтрофилами протеаз, способных активировать ММП [52].

Десквамация эндометрия у человека морфологически наиболее полно описана в работе Garry и др. [16]. Авторы использовали методы гистероскопического и гистологического исследований, а также электронную микроскопию. Они обнаружили, что первоначально происходит нарушение целостности сосудов, которое приводит к появлению в толще эндометрия кровоизлияний, а затем формированию на его поверхности трещин, из которых начинает сочиться кровь. Следом начинается отторжение стромального компартмента вместе с находящимися в нем спиральными артериями, а на последнем этапе отторгается эпителий желез. При этом десквамация функционального слоя происходит не единомоментно, а участками – так, что в ходе менструации обнаруживаются зоны, где процесс ещё только начинается, и зоны, где он уже полностью завершился.

После отторжения функционального слоя поверхность эндометрия представлена стромой базального слоя, с располагающимися в ней доньшками желез, а также устьями спиральных артерий и вен, из которых продолжает сочиться кровь. Перед тем, как покинуть полость матки через цервикальный канал, десквамированные ткани и кровь некоторое время остаются в ней, непосредственно контактируя с поверхностью эндометрия и образуя, таким образом, биологически активный фон для дальнейших процессов восстановления целостности.

Поскольку кровотечение продолжается в течение нескольких суток может возникнуть предположение, что свертывание крови каким-то образом подавляется, однако этому предположению противоречит тот факт, что средний объем выделений за всю менструацию составляет около 40-50 мл, что гораздо меньше, чем объем кровопотери при меноррагиях, вызываемых нарушениями системы

свертывания крови [53]. Продолжительность менструального кровотечения объясняется, по-видимому, тем, что оно начинается на фоне продукции в эндометрии веществ, способствующих как гемостазу (тканевой фактор, эндотелин-1), так и разрушению фибринового сгустка (активаторы плазминогена, ММП) [54]. Это приводит к формированию небольших тромбов в просвете спиральных артерий и тонкой сетки фибрина на поверхности базального слоя эндометрия, что в значительной степени ослабляет, но не останавливает кровотечение [16].

После десквамации функционального слоя и частичного гемостаза начинается процесс восстановления сохранившегося базального слоя эндометрия. Прежде всего обращает на себя внимание быстрая эпителизация, которая начинается приблизительно со 2 дня менструации и завершается к 4-6 дню [16]. При этом она не связана с действием эстрогенов, как полагали ранее. Экспериментально это было подтверждено на мышинной модели менструации, где овариэктомией достигали падения уровня половых стероидных гормонов, вызывая у животных менструацию, а подавления внеяичниковой продукции эстрогенов добивались свободной от фитоэстрогенов диетой и постоянным приемом летрозола [55]. Исследователи показали, что эти экспериментальные воздействия не оказали значимого эффекта не только на эпителизацию, но и на восстановление целостности эндометрия вообще.

При более детальном анализе событий, происходящих после десквамации функционального слоя у людей, было показано, что на поверхности фибринового матрикса, покрывающего сохраняющийся базальный слой, появляются клетки, которые, пролиферируя и мигрируя, обеспечивают быструю эпителизацию [16].

Происхождение этих клеток остается предметом контраверсий уже длительное время. Часть исследователей полагает, что это клетки желез, пролиферирующие и мигрирующие по поверхности стромы, другая часть считает, что они образуются из стромальных клеток путем мезенхимально-эпителиального перехода [56-60]. Данному спору уже около 70 лет, и он по-прежнему остается неразрешенным, поскольку постоянно появляются результаты, подкрепляющие ту или другую точку зрения [61].

Ещё одним важным аспектом быстрого восстановления целостности эндометрия является ангиогенез. Экспериментально это было показано при моделировании менструации на мышах и макаках [62]. Авторы блокировали действие фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в тканях, вводя его ингибитор (VEGF Trap) животным сразу после отмены прогестерона. По окончании менструации они наблюдали ярко выраженное снижение плотности сосудов в восстанавливающемся эндометрии, что указывало на подавление ангиогенеза. Вместе с тем, исследователи обнаружили значительное замедление эпителизации оголенной стромы базального слоя, впервые установив причинно-следственную связь между данным процессом и продукцией VEGF в эндометрии. При этом прямое действие VEGF на эпителий было маловероятным поскольку в эпителиоцитах эндометрия авторами не было обнаружено экспрессии рецепторов к VEGF (VEGFR1, VEGFR2 и NP1), а эксперименты *in vitro* указывали на способность стромальных клеток, экспрессирующих VEGFR2 и NP1, но не эндотелия, усиливать миграцию эпителиоцитов под действием VEGF.

В целом очевидно, что ангиогенез и эпителизация не могут происходить без участия стромальных клеток базального слоя, поскольку именно с этими клетками непосредственно взаимодействуют эпителиоциты, формируя базальную мембрану, а также эндотелиоциты при стабилизации новых сосудов. Каковы молекулярные механизмы этого взаимодействия непосредственно в эндометрии остается неизвестным, однако его результатом становится полное восстановление нормальной структуры тканей, не сопровождающееся образованием рубца.

Резюмируя изложенное, необходимо акцентировать внимание на том, что описанные выше гемостаз, быстрый ангиогенез и эпителизация характерны именно для репаративных процессов, а не для физиологической регенерации. При этом репарация в организме человека чаще сопровождается не полным восстановлением тканей, а формированием рубца в зоне повреждения [63, 64]. Наилучшим образом данный феномен изучен на примере заживления кожной раны. Его центральным эффекторным звеном являются клетки стромы, которые, находясь под действием образующихся в зоне повреждения многочисленных цитокинов, хемокинов,

факторов роста и других стимулов, создают соединительнотканную основу образующейся грануляционной ткани, претерпевая фенотипический переход в миофибробласты [20, 65]. Затем, на более поздних этапах заживления, в фазе ремоделирования, клеточные элементы грануляционной ткани гибнут, а сохраняющиеся при этом белки ВКМ (в основном коллаген I типа) формируют рубцовую ткань [44].

Известно, что в подвергающейся протеолизу строме эндометрия повышается экспрессия белков ВКМ (ряда коллагенов и фибронектина), что было показано в мышинной модели менструации, а также при анализе маток человека, полученных после экстирпации по поводу меноррагии [66, 67]. Вместе с активно идущим в строме базального слоя ангиогенезом и предшествующей ему лейкоцитарной инфильтрацией данные процессы в значительной степени напоминают образование грануляционной ткани в ходе ранозаживления. Однако генерации значимого объема вновь образуемой соединительной ткани (фиброплазии) не происходит, вопреки наличию, казалось бы, достаточных предпосылок. Кроме того, при восстановлении эндометрия не было обнаружено фенотипического перехода стромальных клеток в миофибробласты несмотря на продукцию в эндометрии большого количества трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (ТФР- $\beta 1$). Этот белок является одним из основных индукторов данного процесса при заживлении кожной раны [68, 69].

В контексте изложенного логично поставить вопрос о причинах отсутствия образования рубцовой ткани при восстановлении целостности эндометрия в ходе менструации. Впервые он был сформулировал L.A. Salamonsen в 2003 году [19]. Последующие поисковые исследования позволили описать ряд особенностей данного процесса, а также выявить некоторые звенья механизмов восстановления (изложено выше). Однако до настоящего времени не удалось понять по какой причине не образуется рубцовая ткань. Основываясь на существующих представлениях о механизмах ранозаживления, мы предположили, что безрубцовое восстановление эндометрия может быть связано либо с автономной устойчивостью клеток стромы эндометрия к фиброплазии и фенотипическому

переходу в миофибробласты, либо с продукцией в эндометрии регуляторных молекул, подавляющих данные процессы. Для тестирования выдвинутых гипотез был использован *in vitro* подход, применение которого обосновывалось возможностью выделения подходящих культур клеток, сохранением ими автономных тканеспецифичных свойств, а также моделирования с их помощью фиброплазии и фенотипического перехода в миофибробласты *in vitro*. Ниже данные предпосылки изложены более подробно.

1.4 Мезенхимальные стромальные клетки как объект исследования

В последние 30-40 лет научные направления, посвященные изучению стромальных и стволовых клеток, стали плотно связаны между собой. Это произошло благодаря, прежде всего, работам А.Я. Фриденштейна и соавт. Ими была показана способность фибробластоподобных клеток, выделенных из костного мозга или селезенки, индуцировать (при их гетеротопической трансплантации под капсулу почки) образование, соответственно, кости или стромы селезенки с очагами кроветворения [70]. Результаты этих экспериментов дополняли ряд предшествовавших работ и указывали на возможность эктопического воссоздания стромального компартмента кроветворного органа из отдельных его клеток, предварительно размноженных в культуре. Важно отметить, что точная гистологическая принадлежность данных клеток не была установлена, а сам А.Я. Фриденштейн называл их фибробластами или механоцитами [71].

Учитывая, что в соответствии с гистологической классификацией клетками, образующими костную ткань, считались и продолжают считаться остеобласты, возникло обоснованное предположение о существовании в костном мозге их менее дифференцированных предшественников, которые также являются предшественниками некоторых других типов стромальных клеток, входящих в состав гемопоэтического микроокружения. В дальнейшем это предположение было трансформировано в гипотезу о существовании в костном мозге стромальной стволовой клетки, являющейся предшественницей, как минимум, хондроцитов и остеобластов, а как максимум – многих других типов клеток соединительных тканей. В полном виде она была сформулирована в 1988 г. в статье М. Owen и А.Я.

Фриденштейна [72]. Основными аргументами стали результаты исследований А.Я. Фриденштейна и ряда других авторов по гетеротопической трансплантации, в которых обнаружилось, что стромальные клетки костного мозга могут формировать не только кость, но и хрящ, и, возможно, костномозговые адипоциты [73]. Вместе с тем А.Я. Фриденштейном было обнаружено, что если трансплантировать по отдельности, образующиеся после выделения колонии фибробластоподобных клеток костного мозга, то кость формируется только в 30-40% случаев, из чего был сделан вывод о том, что только некоторая часть в получаемых культурах представлена стволовыми клетками.

В 1991 г. была опубликована статья A.I. Caplan, в которой он предположил, что упомянутые стромальные стволовые клетки – это сохраняющиеся в костном мозге с периода эмбриогенеза мезенхимные стволовые клетки, способные образовывать различные клетки соединительных тканей [74]. Вместе с тем он высказал предположение о том, что раз эти клетки выделяются в культуру из костного мозга и затем пролиферируют, то их можно наращивать в больших количествах, после чего использовать для аутологичной клеточной терапии с целью восстановления поврежденных тканей.

В последующие годы гипотеза A.I. Caplan не была доказана и, по-видимому, оказалась неверна, что он и сам признал в 2017 году [75]. Однако это не означает, что так же были неверны результаты экспериментальных работ, на основе которых формулировалась данная гипотеза; в ближайшей перспективе они, очевидно, будут переосмыслены. Вместе с тем, в период представлений научного сообщества о доказанности существования мезенхимных стволовых клеток в костном мозге взрослого человека было выполнено множество исследований по их поиску в других тканях, выяснению локализации *in vivo*, установлению поверхностных маркеров и дифференцировочного потенциала, оценке регенераторных и иммуномодулирующих свойств. В целом, это привело к значительно более глубокому пониманию биологии первичных культур фибробластоподобных клеток человека. В дальнейшем для преемственности терминологии их стали называть мезенхимальными стромальными клетками, сохранив аббревиатуру МСК. Термин

«мезенхимальные» стал нести лишь описательный смысл, однозначно определяющий морфологию МСК *in vitro* как веретенovidных, похожих на внезародышевую мезенхиму клеток. Помимо морфологии неотъемлемыми признаками МСК *in vitro* остались адгезия к пластику, способность к дифференцировке в остео-, хондро- и адипогенном направлениях, положительность по CD73, CD90, CD105 и отрицательность по маркерам эндотелиальных, гемопоэтических и иммунокомпетентных клеток (CD34, CD45, CD14, CD19, HLA-DR).

Приведенные выше минимальные критерии были окончательно сформулированы в 2006 г. международным обществом клеточной терапии (ISCT) [76]. С одной стороны, они являются искусственными, поскольку изначально подбирались для идентификации мезенхимных стволовых клеток, но оказались для этой цели недостаточными, а с другой – позволяют в значительной мере снизить вариабельность результатов, получаемых различными исследователями, работающими с МСК.

Поиск альтернативных источников МСК привёл к тому, что культуры клеток, соответствующие данным критериям, были выделены из большинства органов человека [77]. Поскольку возможность получения культур фибробластоподобных клеток из стромального компартмента различных органов была известна давно, у ряда исследователей возникло обоснованное предположение о том, что МСК – это «всем известные» фибробласты [78, 79]. Данная точка зрения оказалась лишь отчасти верной в том смысле, что исторически многие исследователи чаще называли фибробластами культуры фибробластоподобных клеток, получаемые из одних органов, например из кожи, в то время как для других органов, например эндометрия, чаще использовался термин «стромальные клетки». Важно обратить внимание на то, что и в одних и в других случаях точное отнесение выделенных клеток к конкретному гистологическому типу не было подтверждено. Поэтому в действительности называть МСК фибробластами оснований не больше, чем мезенхимными стволовыми клетками. Вместе с тем большинство *in vitro* исследований, посвященных изучению фибробластов или стромальных клеток или

стволовых клеток стромы или мезенхимальных стволовых клеток какого-либо органа, скорее всего, обращались к одному и тому же объекту – МСК.

Локализация МСК *in vivo* остается неустановленной в полной мере. Основная сложность заключается в феномене так называемой дедифференцировки, которой подвергаются клетки при их выделении в культуру [80]. Будучи извлеченными из тканей, они теряют те черты фенотипа, которые обусловлены сигналами из нативного микроокружения, и приобретают характеристики, задаваемые условиями культивирования. В результате изменяется не только морфология клеток, но и экспрессия белковых маркеров, используемых для идентификации клеточных типов в тканях, поэтому в культуре установить принадлежность МСК к конкретному типу клеток *in vivo* весьма затруднительно. Кроме того, условия культивирования, которые для МСК в сравнении с другими клеточными типами наименее требовательны, способствуют селекции наиболее приспособленных и быстро пролиферирующих клеток даже в рамках одного клеточного типа.

Одним из подходов к решению задачи выявления локализации МСК в тканях стал предварительный сортинг клеток, который позволяет проверить, какие из выделяемых клеточных типов могут давать начало культурам МСК. Его реализация позволила Crisan и соавт. показать, что, например, перициты, выделенные из разных органов, соответствуют минимальным критериям МСК [81]; ряд дальнейших исследований других авторов подтвердил данную находку [77]. Однако возможность получения культур МСК из перицитов не обозначает невозможность их получения из других клеточных типов. Так, МСК могут быть получены из роговицы – части глаза, в которой полностью отсутствуют сосуды, а клетки стромы представлены кератоцитами, являющимися разновидностью фибробластов [82].

Ещё одним важным следствием интенсивного изучения МСК как средства терапии стало выявление у данных клеток тканеспецифичных особенностей, обнаруженных в многочисленных сравнительных исследованиях [23]. В подобных работах, как правило, сравниваются МСК, выделенные из 3-4 источников, по таким параметрам как иммунофенотип, дифференцировочный потенциал, секреторный

профиль, влияние на ангиогенез и рост нервов, способность подавлять воспаление и др. Как правило, исследователям удается выявить весьма значимые отличия, в том числе в животных моделях. Наличие у культур МСК тканеспецифичных свойств свидетельствует об их обусловленности автономными (не зависящими от условий и контекста) характеристиками.

Резюмируя, можно заключить, что культуры МСК происходят из перицитов, фибробластов и, возможно, других фибробластоподобных клеток, локализующихся в стромальных компартментах различных органов, обладают набором одинаковых признаков *in vitro*, позволяющих идентифицировать их как один тип клеток, сохраняя при этом ряд автономных тканеспецифичных свойств.

1.5 МСК подходят для моделирования фиброплазии и фенотипического перехода в миофибробласты *in vitro*

В ходе заживления кожной раны резидентные стромальные клетки пролиферируют и мигрируют в зону повреждения, запуская *фиброплазию* – образование новой соединительной ткани. Данный процесс начинается уже на 2-3 день на фоне действия медиаторов воспаления, компонентов плазмы крови и регуляторных молекул, выделяемых из кровяного сгустка, формируемого при гемостазе [44]. Через несколько дней, когда острая фаза воспаления начинает завершаться, большая часть осуществляющих фиброплазию клеток совершает фенотипический переход в миофибробласты – клетки, в цитоплазме которых образуются стресс-фибриллы, содержащие α -гладкомышечный актин (α -ГМА) [20]. Необходимость появления данных клеток для ранозаживления была показана их селективной кондиционной деплецией в мышечной модели кожной раны [83].

К клеткам стромы, непосредственно осуществляющим фиброплазию и совершающим фенотипический переход в миофибробласты, достоверно относятся фибробласты дермы, перициты, адвентициальные клетки, а также предшественники адипоцитов, то есть как минимум, большинство фибробластоподобных клеток кожи и подкожной жировой клетчатки, из которых могут происходить культуры МСК [84-86]. Следовательно, МСК представляют

собой подходящий объект для моделирования фиброплазии и фенотипического перехода в миофибробласты *in vitro*.

Условия выделения и культивирования МСК во многом близки тем, в которых находятся стромальные клетки в зоне повреждения при заживлении кожной раны [80]. Получение клеток для первичной культуры сопровождается либо механическим измельчением тканей с использованием скальпелей, ножниц, специальных ножей в диссоциаторах, либо длительной обработкой протеазами, разрушающими ВКМ, а чаще всего комбинацией этих воздействий. Непосредственно в культуре МСК подвергаются постоянному воздействию фетальной бычьей сыворотки (ФБС), являющейся основным компонентом среды роста, поддерживающим пролиферацию клеток. По сравнению с сывороткой крови человека она содержит больше факторов роста и цитокинов, однако по составу – это именно сыворотка крови, с которой клетки стромы в неповрежденных тканях обычно не контактируют.

МСК *in vitro* пролиферируют гораздо быстрее, чем стромальные клетки в физиологически обновляющихся тканях; такая скорость пролиферации скорее характерна для репаративных процессов, в частности, фиброплазии. Миграция МСК, постоянно происходящая при их культивировании, также не характерна для неповрежденных тканей. Ещё одним фактором, действующим на клетки в культуре, является механический стресс, возникающий из-за неравномерной нагрузки на плазмалемму клеток: сверху находится жидкость, в то время как снизу – жесткий пластик. Кроме того, при пассировании МСК открепляют от культуральной посуды действием протеаз, а затем центрифугируют и ресуспендируют. По-видимому, устойчивость клеток стромы к агрессивным условиям, возникающим в зоне повреждения, а также способность к пролиферации и миграции при нахождении в них, обуславливает возможность более легкого получения культур МСК, в сравнении с первичными культурами других клеточных типов.

При длительном культивировании (в течение 2 и более недель) без пассирования МСК способны образовывать многослойную структуру,

являющуюся чем-то промежуточным между клеточной культурой и тканью. В её составе клетки переплетаются и объединяются между собой посредством продуцируемых ими белков ВКМ, формируя единую сеть. Данный феномен изначально представлял интерес как *in vitro* модель фиброплазии, поскольку аналогия представлялась очевидной [87]. В дальнейшем с развитием регенеративной медицины и технологий доставки клеток в виде клеточных пластов было обнаружено, что образуемые МСК многоклеточные многослойные структуры могут быть целиком откреплены от пластика, сохраняя при этом определенную механическую прочность, и использованы в медицинских целях [88]. В результате потенциальная возможность моделирования фиброплазии *in vitro* была показана для МСК различного происхождения [89].

Для индукции фенотипического перехода МСК в миофибробласты *in vitro* оптимально использование ТФР- β 1. Продукция и активация данного фактора роста значительно усиливается в ходе ранозаживления. Подавление его активности блокирующими антителами уменьшает объем образующейся рубцовой ткани, а введение рекомбинантной активной формы – увеличивает [90].

Рецепция ТФР- β 1 клетками осуществляется преимущественно посредством тетрамерного комплекса, состоящего из пары рецепторов I типа (Т β RI) и пары рецепторов II типа (Т β RII). Пара Т β RII содержит сайты узнавания, позволяющие ей первой связываться с ТФР- β 1, после чего к данному комплексу присоединяется пара Т β RI, в результате чего Т β RII кросс-фосфорилирует Т β RI [91]. Фосфорилирование Т β RI, в свою очередь приводит к проявлению его собственной киназной активности и фосфорилированию SMAD2 и SMAD3, так называемых рецептор-активируемых SMAD, которые формируют тримерный комплекс с SMAD4 [92]. Данный комплекс транслоцируется в ядро, где регулирует транскрипцию соответствующих генов [91]. Описанный SMAD-зависимый сигнальный путь является основным (каноническим), однако параллельно могут активироваться некоторые SMAD-независимые сигнальные оси, например, каскады митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK) и малых ГТФаз (RhoA и др.) [92].

Добавление ТФР- β 1 к культурам фибробластов дермы, соответствие которых минимальным критериям МСК было неоднократно продемонстрировано, приводит к повышению экспрессии генов-маркеров миофибробластов – α -гладкомышечного актина (α -ГМА), коллагена I типа, а также сплайс-формы фибронектина, содержащего дополнительный внеклеточный домен А (ДД-А фибронектин) [20, 93, 94]. Вместе с тем усиливается образование стресс-фибрилл, в состав которых включается α -ГМА, повышается способность клеток к контракции, а также образуются крупные фокальные адгезионные контакты, опосредующие взаимодействие микрофиламентов актина через талин, винкулин и интегрины, с белками ВКМ, секреция которых также возрастает [95]. Описанные события происходят в течение 3-4 суток, по их завершении клетки приобретают фенотип миофибробластов. Аналогичное действие ТФР- β 1 оказывает на МСК различного происхождения, в том числе на выделенные из жировой ткани [96, 97].

1.6 МСК, выделяемые из менструального отделяемого, подходят для *in vitro* моделирования процессов, связанных с восстановлением эндометрия

Впервые МСК были выделены из менструального отделяемого в 2007 году [98]. Авторы предположили, что в восстановлении эндометрия в ходе менструации должны участвовать мезенхимные стволовые клетки, мигрирующие из костного мозга, поскольку несколькими годами ранее было показано, что в эндометриальной строме и эпителии реципиентов костномозговых трансплантантов обнаруживались клетки доноров, не совпадающих по генам главного комплекса гистосовместимости [99]. Сбор менструального отделяемого производили при помощи менструальной чаши, после чего разделительным центрифугированием на фиколле из полученного биоматериала выделяли фракцию моноклеаров, которые помещали в пластиковую чашку Петри. Адгезировавшие клетки культивировали до 3-4 пассажа, после чего показали их соответствие минимальным критериям МСК, за исключением непроверенной авторами хондрогенной дифференцировки, которая была продемонстрирована позднее другими исследователями [100, 101].

В дальнейшем гипотеза о костномозговом происхождении МСК, выделяемых из менструального отделяемого (МСКМ), была скомпрометирована, поскольку в сравнительных исследованиях с МСК костного мозга были показаны значительные различия по целому ряду параметров (табл. 1).

Таблица 1. Отличия МСКМ от МСК костного мозга.

Сравниваемый параметр	Выявленные отличия МСКМ	Источник
Остеогенная дифференцировка <i>in vitro</i>	Меньшая выраженность минеральных депозитов, меньшая экспрессия щелочной фосфатазы	[103]
Хондрогенная дифференцировка <i>in vitro</i>	Меньшая экспрессия белков-маркеров хондроцитов	[104]
Адипогенная дифференцировка <i>in vitro</i>	Явные признаки дифференцировки не проявляются в отсутствии розиглитазона	[105]
Децидуализация <i>in vitro</i>	Большой уровень секретируемых маркеров децидуализации (пролактина и IGFBP-1).	[106]
Анализ транскриптома	Обнаружено 1095 дифференциально экспрессируемых генов.	[107]
Ангиогенный потенциал	Более выраженная стимуляция ангиогенеза посредством паракринно продуцируемых факторов.	[108]
Иммуномодулирующие свойства	Отсутствие подавления пролиферации Т-клеток; более выраженная способность ослаблять реакцию «трансплантат против хозяина».	[109, 110]

Также в модели трансплантации костного мозга облученным мышам дикого типа от мышей, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок в гемопоэтических и других костномозговых клетках, были получены результаты,

опровергающие происхождение эпителиальных, эндотелиальных и стромальных клеток эндометрия из костного мозга [102].

Поскольку МСКМ получают из менструального отделяемого возникло мнение, что они происходят преимущественно из десквамируемых фрагментов стромы функционального слоя. Данной точке зрения противоречит тот факт, что в большинстве исследований авторы выделяли МСКМ из жидкой части получаемого биоматериала, то есть из клеточной суспензии, а не отторгаемых крупных частей. Исходя из механизмов менструации, главным способом высвобождения клеток стромы эндометрия в содержимое полости матки является лизис ВКМ, основной зоной которого становится плоскость, разделяющая функциональный и базальный слои. Следовательно, в жидкую часть менструального отделяемого могут попадать клетки не только отторгаемых фрагментов функционального слоя, но и с «оголенной» поверхности стромы базального слоя. Находясь в полости матки в составе менструального отделяемого, МСКМ остаются жизнеспособными, а после выделения в культуру пролиферируют в течение длительного времени, что указывает на их принадлежность к прогениторным, а не терминально дифференцированным клеткам. Поскольку для восстановления эндометрия в любом случае требуется активность клеток стромы базального слоя, способных сохранять жизнеспособность под прямым действием менструального отделяемого, МСКМ являются адекватным объектом для *in vitro* моделирования подобных процессов. Кроме того, данные клетки соответствуют минимальным критериям МСК, поэтому также могут быть использованы для *in vitro* моделирования фиброплазии и фенотипического перехода в миофибробласты.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Общая схема экспериментального исследования

Для решения поставленных задач нами были предложены следующие подходы. На первом этапе необходимо было выделить МСКМ, МСК дермы (МСКД), МСК жировой ткани (МСКЖТ) и нарастить достаточное их количество культивированием до 2-3 пассажа. Всего было запланировано получить по 3 культуры МСК различного происхождения. По достижении 2-3 пассажа клетки криоконсервировали таким образом, чтобы сохранялось не менее трех криопробирок для каждой культуры. Перед проведением всех последующих экспериментов клетки размораживали и культивировали до 4-5 пассажа, на которых оценивали иммунофенотип.

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. Клетки высаживали в равном количестве на соответствующую пластиковую посуду и через 4-5 суток, по достижении 100% конфлюэнтности, полную среду роста меняли на одну из экспериментальных или контрольных сред, в зависимости от дизайна экспериментов (табл. 1). Оценку мультипотентности, способности к контракции и фиброплазии проводили в дальнейшем сразу для всех исследуемых культур в соответствующих экспериментальных или контрольных условиях (табл. 1).

Таблица 1. Условия проведения экспериментов на МСК *in vitro*.

Задача	Экспериментальные условия	Контрольные условия
Оценка способности исследуемых адипогенной, МСК к остеогенной	Среда для адипогенной, или остеогенной	Полная среда роста для каждого типа исследуемых МСК (см.

хондрогенной дифференцировке	хондрогенной дифференцировки	Культивирование МСК)
Проверка способности исследуемых МСК к фиброплазии в стандартных условиях культивирования	Полная среда роста для каждого типа исследуемых МСК (см. протоколы культивирования)	-
Проверка способности исследуемых МСК к фенотипическому переходу в миофибробласты под действием ТФР-β1	DMEM/F12 с добавлением 10 нг/мл ТФР-β1 и 100 мкМ магния аскорбилфосфата	DMEM/F12 с добавлением 10 нг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 100 мкМ магния аскорбилфосфата
Проверка способности исследуемых МСК к контракции под действием ТФР-β1.	Коллагеновый диск с DMEM и 10 нг/мл ТФР-β1	Коллагеновый диск с DMEM и 10 нг/мл БСА
Оценка действия растворимых факторов, образуемых при восстановлении эндометрия в ходе менструации, на исследуемые МСК в отношении фиброплазии и фенотипического перехода в миофибробласты	DMEM/F12 с добавлением 10% сыворотки менструального отделяемого	DMEM/F12 с добавлением 10% сыворотки периферической крови

2.2. Получение объектов исследования

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).

Набор доноров биоматериала

Донорами менструального отделяемого и цельной крови были клинически здоровые женщины репродуктивного возраста. Все потенциальные доноры добровольно проходили медицинский опрос, общий и специальный осмотр врачом акушером-гинекологом, ультразвуковое исследование репродуктивных органов, сдавали мазки из половых путей для цитологического, микробиологического и ПЦР исследований, а также венозную кровь для общего и биохимического анализа крови. По результатам осмотра врача акушера-гинеколога, лабораторных и инструментальных исследований мы принимали решение о включении потенциального донора в исследование.

Критериями включения в исследование были:

1. Возраст от 18 до 35 лет.
2. Нормальный менструальный цикл.
3. Добровольное желание стать донором.
4. Возможность доставки биоматериала от места жительства донора в лабораторию.

Критериями исключения были:

1. Заболевания репродуктивных органов, в т.ч. нарушения менструаций и менструального цикла.
2. Острые заболевания, системные заболевания, обострения хронических заболеваний.
3. Толщина эндометрия менее 7 мм по данным ультразвукового исследования.
4. Превышение допустимого показателя содержания нейтрофилов в мазке из цервикального канала.
5. Нарушения нормального состава микрофлоры влагалища по данным ПЦР исследования.

6. Превышение или недостижение референсных показателей результатов общего и биохимического анализа крови.

Критерии включения и исключения были подобраны таким образом, чтобы минимизировать вариабельность получаемых результатов и повысить их воспроизводимость за счет сопоставимости характеристик доноров, в т.ч. характеристик менструации и менструального цикла, нормальное течение которых в некоторой степени отражало отсутствие нарушений в восстановлении и обновлении эндометрия.

Донорами жировой ткани и дермы были пациенты МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, поступавшие с диагнозом «пупочная грыжа» для плановой операции. В связи с подготовкой к операции доноры были соответствующим образом обследованы, что позволяло не проводить дополнительных лабораторных и инструментальных исследований для принятия решения об их включении в исследование.

Критериями включения были:

1. Возраст от 18 до 60 лет.
2. Предстоящая плановая операция с иссечением части кожи живота и подкожной жировой клетчатки.
3. Добровольное согласие донора.

Критериями исключения были:

1. Острые заболевания, системные заболевания, обострения хронических заболеваний.
2. Клинически значимое отклонение показателей общего и биохимического анализов крови от референсных значений

Выделение сыворотки и МСК менструального отделяемого

Менструальное отделяемое представляет собой смесь тканей и биологических жидкостей, состоящую из крови, отторгаемых частей эндометрия, продуцируемых эндометрием веществ, клеток, не удерживающихся на раневой поверхности, а также влагалищных выделений в случае, если менструальное отделяемое покидает половые пути естественным образом. Полость матки

здоровых женщин, как правило, стерильна или содержит очень небольшое число бактерий, в то время как влагалище густо заселено ими [115]. Для выполнения планируемых экспериментов необходимо было обеспечить достаточно высокую степень чистоты биоматериала как в отношении контаминации микроорганизмами, так и в отношении примесей влагалищных выделений. С технической точки зрения идеальным способом мог бы представляться забор менструального отделяемого непосредственно из полости матки, однако с точки зрения медицинской этики это неприемлемый подход, поскольку есть вероятность причинения вреда здоровью донора, кроме того, нам требовался больший объем менструального отделяемого, чем тот, который можно получить при единовременном заборе из полости матки. Оптимальным компромиссом представлялось использование для сбора менструального отделяемого менструальной чаши, учитывая, что в литературе уже была показана возможность её использования с указанной целью [116]. К моменту начала данной работы это гигиеническое средство уже несколько лет свободно распространялось на отечественном рынке и представляло собой силиконовую емкость, которую доноры могли самостоятельно устанавливать во влагалище. При правильном введении в половые пути чаша эффективно обеспечивала как гигиенические потребности доноров, так и достижение наших целей при сборе менструального отделяемого. Установка менструальной чаши предполагала её достаточно глубокое введение во влагалище таким образом, чтобы верхняя граница чаши достигала или была очень близка к маточному зеву, в противном случае чаша не выполняла ни функций гигиенического средства, ни средства для сбора биоматериала. Поскольку форма чаши представляла собой направленный вершиной книзу конус, она не мешала влагалищным выделениям покидать половые пути естественным образом. При этом менструальное отделяемое скапливалось в чаше. Таким образом, использование менструальной чаши в достаточной мере могло обеспечить минимизацию примеси влагалищных выделений в собираемом донорами биоматериале, однако сохранялась опасность контаминации менструального отделяемого микроорганизмами.

В работах других авторов, задачей которых было выделение МСК из менструального отделяемого, проблема контаминации решалась непосредственным добавлением антибиотиков и антимикотиков к биоматериалу [117, 118]. В нашем случае такой подход был нежелательным, поскольку стояла задача выделить и исследовать свойства не только клеток, но и сыворотки, поэтому мы отказались от добавления антибиотиков к получаемому биоматериалу.

При отработке протокола нам удавалось выделять МСК в разные дни менструации, однако получить пригодную для дальнейшей работы сыворотку получалось преимущественно во второй день, независимо от индивидуальных различий доноров по длительности менструации. Случаи обнаружения контаминации биоматериала, полученного во второй день, также были очень редки. По этим причинам второй день менструации был определен, как оптимальный временной интервал для сбора менструального отделяемого. Ниже представлены протоколы выделения из него МСК и сыворотки менструального отделяемого (СМО), ставшие стандартными в рамках данного исследования.

Протокол выделения сыворотки менструального отделяемого (СМО) и МСКМ. Используя менструальную чашу (Тюльпан, Россия) в соответствии с инструкцией к данному изделию, здоровые доноры, начиная с утра второго дня менструации, самостоятельно собирали менструальное отделяемое, скопившееся в чаше за 6-8 часов, в 50 мл стерильную пробирку, которую в течение 2-3 часов доставляли на холоду (+4°C) в лабораторию, где проводились следующие процедуры. Сразу после получения менструальное отделяемое разбавляли в 2 раза средой DMEM/F12 (Gibco, США), аккуратно перемешивали и центрифугировали (300g, 20 мин); супернатант (раствор СМО) отбирали в чистую пробирку, которую оставляли в штативе до следующего этапа центрифугирования.

Осадок клеток разводили в 4-х объемах «буфера для разведения», состоящего из 1% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (Gibco, США) в растворе Хэнкса (Панэко, Россия) с добавлением 5мМ ЭДТА (Panreac, США). Полученную суспензию сначала активно пипетировали 25 мл серологической пипеткой, после чего аккуратно наслаивали на 13 мл фиколла с плотностью 1,077 г/см³ (Панэко,

Россия) в 50 мл пробирке. Пробирку оставляли в штативе на 10 мин для седиментации кровяных сгустков в толщу фиколла, после чего центрифугировали (500g, 40 мин) параллельно с раствором СМО, выделенным на предыдущем этапе.

После центрифугирования из пробирки с раствором СМО шприцем с иглой 21G отбирали супернатант и фильтровали его через фильтр 0,22 мкм (TRP, Швейцария). Полученный фильтрат представлял собой стерильный 25-30% раствор СМО в среде DMEM/F12 (Gibco, США).

Из пробирки с фиколлом и суспензией клеток 3/4 объема супернатанта отбирали и утилизировали, а оставшуюся 1/4, а также клетки и маленькие кусочки ткани, находящиеся на поверхности фиколла, собирали в 15 мл пробирку; объем содержимого доводили до 14 мл «буфером для разведения» и центрифугировали (300g, 10 мин). Полученный осадок ресуспендировали в 2 мл среды DMEM/F12 (Gibco, США) с 10% ФБС (HyClone, США) и переносили в 35-мм чашку на 1 час; затем не прикрепившиеся к пластику клетки отбирали и утилизировали, а среду меняли на свежую. Через 24 часа среду заменяли ещё раз, после чего клетки культивировали так, как изложено в разделе «Культивирование МСК».

Пригодность раствора СМО для культивирования клеток оценивали, поместив 500 мкл его объема в лунку 48-луночного планшета, который сразу ставили в CO₂-инкубатор; оставшуюся СМО замораживали и хранили при -20°C. Через 24 часа инкубации методом фазово-контрастной микроскопии оценивали наличие в СМО агрегатов или явного роста микроорганизмов и, в случае их отсутствия, замороженный ранее образец сохраняли для дальнейшего использования. Перед началом экспериментов все сохраненные образцы СМО размораживали при комнатной температуре и затем пулировали в один раствор.

В части выделения МСК описанный протокол основан на уже опубликованных к моменту начала данного исследования работ других авторов; скорости и временные интервалы центрифугирования, а также разведения на разных этапах подобраны таким образом, чтобы минимизировать повреждение клеток, но в то же время обеспечить достаточный их выход [117, 118].

Выделение сыворотки периферической крови (СПК). При выделении СПК основной задачей было обеспечить сопоставимость протокола ее выделения с протоколом выделения СМО, ввиду чего был добавлен ряд необязательных этапов. Периферическую венозную кровь (10-15 мл) получали однократным забором из кубитальной вены во второй день менструации от доноров менструального отделяемого. Цельную венозную кровь собирали в пробирки с активатором свертывания (BD Vacutainer, США) и после образования свертка центрифугировали (300g, 20 мин). Сыворотку отбирали 10 мл шприцем с иглой 21G и разводили в 4 раза средой DMEM/F12 (Gibco, США), после чего пропускали через фильтр 0,22 мкм (TPP, Швейцария), замораживали и хранили при -20°C . Перед началом экспериментов полученные от всех доноров образцы СПК размораживали при комнатной температуре и пулировали в один раствор.

Выделение МСКЖТ. Выделение МСКЖТ хорошо отработан и длительное время применяется в нашей лаборатории, позволяя получать культуры клеток и хранить их в криобанке. Данные культуры были использованы в нашей работе. Ниже приведен наш рутинный протокол выделения МСКЖТ.

Образцы жировой ткани объемом от 1 до 10 см³ помещали в 50 мл пробирку с раствором Хэнкса (Панэко, Россия), содержащим 500 ед/мл пенициллина и 500 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США), и доставляли в лабораторию для дальнейших процедур. В ламинарном боксе полученную ткань переносили в чашку Петри и измельчали стерильными хирургическими ножницами, после чего его перемещали в пробирку для ферментативной обработки. Далее к измельченной жировой ткани добавляли равный ей объем среды AdvanceStem Medium (HyClone, США), содержащей 200 ед/мл коллагеназы I типа (Worthington, США) и 30 ед/мл диспазы (Corning, США). Ферментативную обработку проводили при 37°C в течение 60 минут, сопровождая интенсивным встряхиванием каждые 5-10 минут, после чего ферменты инактивировали эквивалентным объемом среды AdvanceStem Medium (HyClone, США), содержащей 10% AdvanceStem Supplement (HyClone, США). Полученную суспензию центрифугировали (200g, 10 мин), супернатант и флотирующую фракцию жировой ткани утилизировали, а осадок

ресуспендировали в среде AdvanceStem Medium (HyClone, США) с 10% AdvanceStem Supplement (HyClone, США).

Полученную суспензию фильтровали через 100 мкм нейлоновые фильтры (BD Falcon, США), чтобы отсеять непереваренные куски ткани; фильтрат центрифугировали (200g, 5 мин), а супернатант удаляли. Осадок ресуспендировали в среде AdvanceStem Medium (HyClone, США) с 10% AdvanceStem Supplement (HyClone, США) и переносили в чашку Петри, которую помещали в CO₂-инкубатор. Через 24 часа среду меняли на свежую, после чего клетки культивировали так, как изложено в разделе «Культивирование МСК».

Выделение МСКД. Выделение фибробластов кожи хорошо отработан и длительное время применяется в нашей лаборатории, позволяя получать культуры клеток и хранить их в криобанке. Данные культуры были использованы в нашей работе в качестве МСКД. Ниже приведен наш рутинный протокол выделения фибробластов кожи.

Образцы кожи измельчали стерильными хирургическими ножницами до кусочков размером не более 0,25 см³ и перемещали в 50 мл пробирку. К измельченной коже добавляли равный объем среды DMEM, содержащей 200 ед/мл коллагеназы I типа (Worthington, США) и 30 ед/мл диспазы (Corning, США). Ферментативную обработку проводили в течение 60 мин при 37°C, сопровождая интенсивным перемешиванием каждые 5-10 мин, после чего ферменты инактивировали добавлением эквивалентного объема среды DMEM (Gibco, США), содержащей 10% ФБС (Gibco, США).

Полученную суспензию центрифугировали (200g, 10 мин), супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в полной среде роста и перемещали в чашку для культивирования клеток. 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 AdvanceStem Medium (HyClone, США) с 10% AdvanceStem 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% конfluenceности клетки пассировали в соотношении 1:3-1:4. Для открепления клеток с поверхности пластика использовали 0,05% раствор трипсина-ЭДТА (Gibco, США). Полученную суспензию перемещали в пробирку с 5 мл полной среды роста и центрифугировали (200g, 5 мин), затем супернатант отбирали, а осадок ресуспендировали в полной среде роста и перемещали в новые чашки Петри. Как в процессе наращивания культур, так и в ходе всех дальнейших экспериментов культивирование проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂.

2.3. Оценка соответствия выделенных культур минимальным критериям МСК

Для иммунофенотипирования исследуемых культур необходимо было оценить долю клеток в популяции, несущих на своей поверхности маркеры МСК и не несущих маркеров иммунокомпетентных клеток, гемопоэтических стволовых клеток костного мозга и эндотелиоцитов. Маркерами МСК, в соответствии с консенсусным мнением ISCT, были выбраны CD73, CD90 и CD105. Среди иммунокомпетентных клеток наиболее вероятными типами, способными к росту на пластике, являются макрофаги и дендритные клетки, однако, присутствие других типов иммунокомпетентных клеток также вероятно. Маркером клеток лейкоцитарного гемопоэтического ряда был выбран CD45, маркером макрофагов и дендритных клеток – CD14, а маркером В-лимфоцитов периферических тканей – CD20. Маркером эндотелиальных клеток и стволовых гемопоэтических клеток были выбраны CD31 и CD34 соответственно.

Иммунофенотипирование исследуемых культур проводили на 4-5 пассаже методом проточной цитометрии, поскольку он наилучшим образом позволяет оценить долю клеток, несущих тот или иной маркер. В каждом повторе присутствовали МСКМ, МСКД и МСКЖТ, иммунофлуоресцентное мечение которых проводилось одновременно, одинаковым образом. Для совместного мечения на клетках маркеров МСК, а также маркеров иммунокомпетентных клеток

и стволовых клеток костного мозга использовали «MSC Phenotyping Kit» (130-095-198, Miltenyi Biotec GmbH, Германия), содержащий в одной банке антитела к CD73, конъюгированные с аллофикоцианином, антитела к CD90, конъюгированные с флуоресцеином, антитела к CD105, конъюгированные с фикоэритрином и антитела к CD45, CD20, CD14, CD34, конъюгированные с перидинин-хлорофилл-протеиновым комплексом, а в другой банке соответствующие изотипические контрольные антитела, конъюгированные с одноименными флуорофорами. Мечение на CD31 проводилось отдельно, для чего использовали антитела к CD31, конъюгированные с флуоресцентной меткой «brilliant violet 421» (303124, Biolegend, США), и соответствующие изотипические контрольные антитела, конъюгированные с одноименным флуорофором (400158, Biolegend, США).

Для клеток, выделенных из того или иного источника, предварительно однократно проводилось отдельное мечение маркеров антителами, конъюгированными с одним флуорофором, для оценки перекрытия флуоресцентного сигнала с каналами детекции других флуорофоров. Это делалось для получения компенсаторных матриц и вычета ложноположительной составляющей сигнала в каждом канале детекции флуоресценции при дальнейшем анализе результатов проточной цитометрии. Применимость компенсаторных матриц для анализа повторных результатов обеспечивалась применением стандартизованного протокола мечения клеток антителами, а также использованием одинаковых настроек интенсивности света лазеров и напряжения на фотоумножителях проточного цитометра.

При сравнении распределений флуоресцентного сигнала от клеточных суспензий, меченных специфическими антителами, с распределением флуоресцентного сигнала от клеточных суспензий, меченных контрольными изотипическими антителами, применяли так называемое «правило 2 %», которое заключалось в признании несущими антиген интереса всех клеток, интенсивность флуоресцентного сигнала от которых была выше, чем у 98% процентов клеток, меченных контрольными изотипическими антителами.

Протокол иммунофлуоресцентного мечения МСК для проточной цитометрии

Клетки на 10-сантиметровых чашках Петри промывали 10 мл раствора Версена (Панэко, Россия) в течение 5 минут, после чего их открепляли от пластика инкубированием с 1 мл 0,05% раствора трипсина-ЭДТА (Gibco, США) в CO₂-инкубаторе в течение 2-3 минут. После открепления клеток трипсин сразу ингибировали 3-4 мл 10% раствора ФБС в DMEM и собирали в 15 мл пробирку, после чего полученный объем суспензии разделяли на 4 равные части в 4 пробирки для проточной цитометрии и центрифугировали (300g, 10 мин). После центрифугирования супернатант отбирали, а осадки клеток ресуспендировали в 100 мкл «буфера для проточной цитометрии», состоящего из раствора Хэнкса (Панэко, Россия) с 1% бычьим сывороточным альбумином (БСА) (Sigma, США). Затем, в первую пробирку к полученной суспензии добавляли коктейль антител из «MSC Phenotyping Kit» (130-095-198, Miltenyi Biotec GmbH, Германия), специфичных к CD73, CD90, CD105, CD14, CD20, CD34 и CD45, во вторую пробирку – соответствующий коктейль контрольных изотипических антител из того же коммерческого набора, в третью пробирку – антитела, специфичные к CD31 (303124, Biolegend, США), в четвертую – соответствующие контрольные изотипические антитела (400158, Biolegend, США). Клетки инкубировали с антителами в течение 10 мин в темноте при 4°C, затем разводили в 500 мкл «буфера для проточной цитометрии», отмывали центрифугированием (300g, 10 мин) и снова разводили в 500 мкл «буфера для проточной цитометрии».

Детекцию флуоресценции проводили сразу после мечения клеток антителами на проточном цитометре BD LSR Fortessa (BD, США). Для каждого измерения записывали не менее 10 тыс. событий. Полученные результаты анализировали в программе FlowJo (BD, США).

Адипогенная и остеогенная дифференцировки. Для индукции дифференцировки выделенных МСК (n=3 для каждого источника клеток) в адипогенном и остеогенном направлениях использовали «StemPro Adipogenesis Differentiation Kit» и «StemPro Osteogenesis Differentiation Kit» (оба – Gibco, США)

по инструкции производителя. В состав каждого из указанных наборов входила базовая среда для культивирования клеток и саплемент, которые смешивались в соотношении 10:1 перед началом протокола дифференцировки; готовую дифференцировочную среду хранили на +4°C.

В лунки 12-луночного планшета помещали по 100 тыс. клеток и культивировали в течение 2-3 дней до достижения 100% конфлюэнтности, затем среду роста меняли на соответствующую среду, индуцирующую дифференцировку. В качестве контроля использовали соответствующие полные среды роста.

Для адипогенной дифференцировки клетки культивировали в течение 14 суток, производя замену среды через каждые 2-3 суток, одновременно меняя полную среду роста в контрольных лунках. При каждой смене среды осуществлялся визуальный контроль состояния клеточных культур и отсутствия контаминации микроорганизмами. По завершении протокола адипогенной дифференцировки клетки фиксировали 4% раствором формальдегида (Panreac, США) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в течение 30 мин, после чего зафиксированные культуры окрашивали раствором масляного красного (Chemicon, США) для выявления липидных капель. Ядра докрасивали гематоксилином.

Для остеогенной дифференцировки клетки культивировали в течение 21 суток, производя замену среды через каждые 3-4 суток, аналогично меняя полную среду роста в контрольных лунках и контролируя нормальное состояние клеточных культур и отсутствие контаминации микроорганизмами. По завершении протокола остеогенной дифференцировки клетки также фиксировали 4% раствором формальдегида (Panreac, США) в ФСБ в течение 30 мин, после чего зафиксированные культуры окрашивали раствором ализаринового красного (Chemicon, США).

Получение изображений окрашенных культур в проходящем свете получали на инвертированном микроскопе Leica DMI8, оснащенном камерой DFC7000T, используя одинаковые настройки интенсивности света и камеры для всех образцов. Для учета неравномерности освещения поля зрения производили съемку черного и

белого поля. Постобработку изображений проводили в программе Fiji (НИН, США).

Хондрогенная дифференцировка. Для индукции дифференцировки МСК в хондрогенном направлении использовали «StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit» (Gibco, США) по инструкции производителя. Центрифугированием (300g, 10 мин) в 15 мл пробирках (Corning, США) формировали осадки, состоящие из 350 тыс. клеток. Супернатант утилизировали, а к осадку аккуратно добавляли 1,5 мл дифференцировочной среды, после чего обычные пробки 15 мл пробирок заменяли на аналогичные со встроенным воздушным фильтром. В качестве контроля использовали полные среды роста для каждого типа клеток.

Через 4 суток после начала эксперимента клеточные осадки трансформировались в сфероиды, что позволяло производить смену среды каждые 3-4 суток без центрифугирования. По завершении протокола дифференцировки сфероиды замораживали в среде Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek, США). На криотоме Leica CM1850 с каждого образца получали не менее 10 срезов толщиной 10 мкм, которые помещали на одно покровное стекло и фиксировали 4% раствором формальдегида в ФСБ в течение 15 мин. После промывки в ФСБ стекла со срезами дифференцированных и контрольных сфероидов окрашивали раствором альцианового синего (Sigma, США). Окрашенные срезы фотографировали на микроскопе Leica DM6000 оснащенном камерой DFC420, а анализ результатов проводили в программе Fiji (НИН, США).

2.4. 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 клетки фиксировали 4% раствором формальдегида в ФСБ, после чего ядра метили DAPI (Sigma-Aldrich, США). Изображения полученных образцов получали на инвертированном микроскопе Leica DMI8, оснащенном камерой DFC7000T.

2.5 Оценка способности МСК к индуцируемому ТФР-β1 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-β1 (Cell Signaling Technology, 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 Лэмбли (BioRad, США) для иммуноблоттинга, а клетки в 24-луночных планшетах фиксировали 4% раствором формальдегида (Panreac, США) на ФСБ для иммунофлуоресцентного анализа. В полученных образцах далее определяли белки-маркеры миофибробластов и содержание фосфорилированной формы относительно общего SMAD2.

2.6 Оценка способности МСК к контракции

МСК открепляли от пластика и центрифугировали (200g, 5 мин). Супернатант утилизировали, клетки ресуспендировали в ФСБ и помещали в 1,5 мл пробирки в количестве 40, 80 или 160 тыс. После центрифугирования (200g, 5 мин) клетки ресуспендировали в 400 мкл DMEM (Gibco, США) с добавлением 10 нг/мл ТФР-β1 или БСА (Cell Signaling Technology, США). Затем в пробирку дополнительно вносили 200 мкл свиного коллагена (3 мг/мл в 0,1% уксусной кислоте, Имтек, Россия). В полученную суспензию добавляли по каплям 1М NaOH (Panreac, США) до нормализации pH, затем 500 мкл суспензии переносили в лунки 24-луночного планшета. Через 30 мин коллаген при комнатной температуре полимеризовался, после чего в лунки добавляли по 400 мкл среды DMEM (Gibco, США) и механически открепляли коллагеновые диски от стенок. Съемку 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). По результатам обсчета в каждой

временной точке для каждой культуры МСК была вычислена средняя относительная площадь диска (в %), которую использовали для оценки контракции.

2.7 Оценка концентрации ТФР-β1 в исследуемых образцах сывороток

Для измерения концентрации ТФР-β1 методом иммуноферментного анализа (ИФА) в растворах СМО, СПК и ФБС использовали «TGF-β1 Quantikine ELISA Kit» (R&D Systems, США) по инструкции производителя. После завершения протокола оптическое поглощение в лунках планшета измеряли на спектрофотометре EnVision VICTOR X3 (Perkin Elmer, США).

2.8 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 для конфокальной микроскопии фиксировали для иммунофлуоресцентного анализа 4% раствором формальдегида (Panreac, США) в ФСБ. Полученные результаты оценивали, используя образцы, культивированные с ФБС, для нормировки, а культивированные с СПК – как отрицательный контроль, не содержащий факторов, продуцируемых при восстановлении эндометрия, но имеющий в своем составе системные циркулирующие факторы.

2.9 Определение в полученных клеточных лизатах уровня белков-маркеров миофибробластов и степени активации SMAD-зависимого сигнального пути методом иммуноблоттинга

Электрофорез белков проводили по методу Лэммли [119]; соотношение акриламида и метилен-бис-акриламида в концентрирующем (4% акриламида) и разрешающем (12,5 % акриламида) гелях составляло 37,5:1.

После электрофореза белки переносили на мембрану из поливинилиденфторида (Amersham, США), а иммуноблоттинг производили по методу Towbin [120]. Перенос проводили в буфере для переноса белков (48 мМ Трис-НСl буфер с рН9,2, содержащий 39 мМ глицина и 20% этанола) [121] в течение 16 часов при постоянном напряжении 30 В.

После переноса белков мембраны блокировали 5% раствором обезжиренного молока в ФБС с 0,1% Tween-20 (Panreac, США) и инкубировали с первичными антителами к α -ГМА (904601, Biolegend, США), винкулину (V4139, Sigma, США), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (ГАФД) (2118s, Cell Signaling Technology, США), SMAD2 (3122S, Cell Signaling Technology, США), фосфо-SMAD2 (3108S, Cell Signaling Technology, США), коллагену I типа (ab34710, Abcam, Великобритания) или ДД-А фибронектину (ab6328, Abcam, Великобритания) с последующей инкубацией с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (ИМТЭК, Россия).

Люминесцентный сигнал после добавления субстрата Clarity ECL Solution (BioRad, США) или ClarityMax ECL Solution (BioRad, США) детектировали на ChemiDoc Touch (BioRad, США), а для последующей цифровой денситометрии использовали программу ImageLab (BioRad, США).

2.10 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 в течение 10

мин, после чего перед мечением α -ГМА и винкулина пермеабилizировали 0,2% раствором Тритона-X100 (Panreac, США) на ФСБ. Перед мечением коллагена I типа и ДД-А фибронектина пермеабилizацию не проводили. Блокировку неспецифического связывания производили 10% раствором козьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, США) в растворе Хэнкса (Панэко, Россия) в течение 1 часа, затем образцы инкубировали в течение 16 часов при 4°C с антителами к α -ГМА (ab5694, Abcam, США), винкулину (V9264, Sigma, США), коллагену I типа (ab34710, Abcam, Великобритания) или ДД-А фибронектину (ab6328, Abcam, Великобритания). После отмывки образцов от первых антител проводили инкубацию с соответствующими вторыми антителами (Invitrogen, США) в течении 2 часов при комнатной температуре. После каждого этапа (за исключением блокировки) образцы промывали ФСБ 3 раза по 5 мин. Ядра метили DAPI (Sigma-Aldrich, США) в течение 10 мин с последующей однократной промывкой ФСБ. По завершении протокола мечения ФСБ оставляли в лунках и чашках Петри, после чего анализировали образцы 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 (NIH, США), применяя соответствующие плагины. Для оценки колокализации получаемых сигналов при двойном мечении использовали плагин «Coloc 2»; для реконструкции трехмерных изображений – плагин «3D viewer»; для сопоставления уровней локализации белков ВКМ – плагин «3D Object».

2.11 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 $\alpha = 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Оценка соответствия культур МСК менструального отделяемого, дермы и жировой ткани минимальным критериям ISCT

При типировании МСК, использованных в ходе выполнения данной работы, мы ориентировались на минимальные критерии 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 [76, 122].

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; в каждый повтор включали по 1 образцу МСКМ, МСКД и МСКЖТ 4-5 пассажа (рис. 1, А). Гистограммы распределений интенсивности флуоресценции, полученные от МСКМ, МСКД и МСКЖТ, меченых одинаковыми антителами, немного отличались между собой по форме и средней интенсивности флуоресценции, что могло объясняться различиями исследуемых клеток по размеру. Дистанции расхождения пиков гистограмм, полученных от образцов, меченных специфическими антителами к положительным маркерам МСК и соответствующими изотипическими контрольными антителами, были ярко выражены и сопоставимы у всех исследуемых культур. Аналогичные дистанции для маркеров эндотелиальных, иммунокомпетентных и гемопоэтических клеток (CD31, CD34, CD14, CD20, CD45) были минимальны. Для оценки относительной представленности положительных по исследуемым маркерам клеток использовали 2% отсечку по контрольным образцам (табл. 2).

Таблица 2. Относительное содержание клеток, положительных по исследуемым кластерам дифференцировки, в культурах МСК

	CD73	CD90	CD105	CD14, CD20, CD34, CD45	CD31
	Среднее значение \pm стандартное квадратичное отклонение, %				
МСКМ	98,6 \pm 1,1	99,9 \pm 0,1	97,1 \pm 2,7	3,9 \pm 1,8	1,7 \pm 0,3
МСКД	99,1 \pm 0,6	99,9 \pm 0,1	99,8 \pm 0,15	3,3 \pm 1,1	1,6 \pm 0,3
МСКЖТ	99,7 \pm 0,2	98,6 \pm 1,2	97,5 \pm 2,2	2,9 \pm 1,2	1,5 \pm 0,3

Во всех исследуемых культурах (по 3 донора для каждого источника клеток) 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, Б).

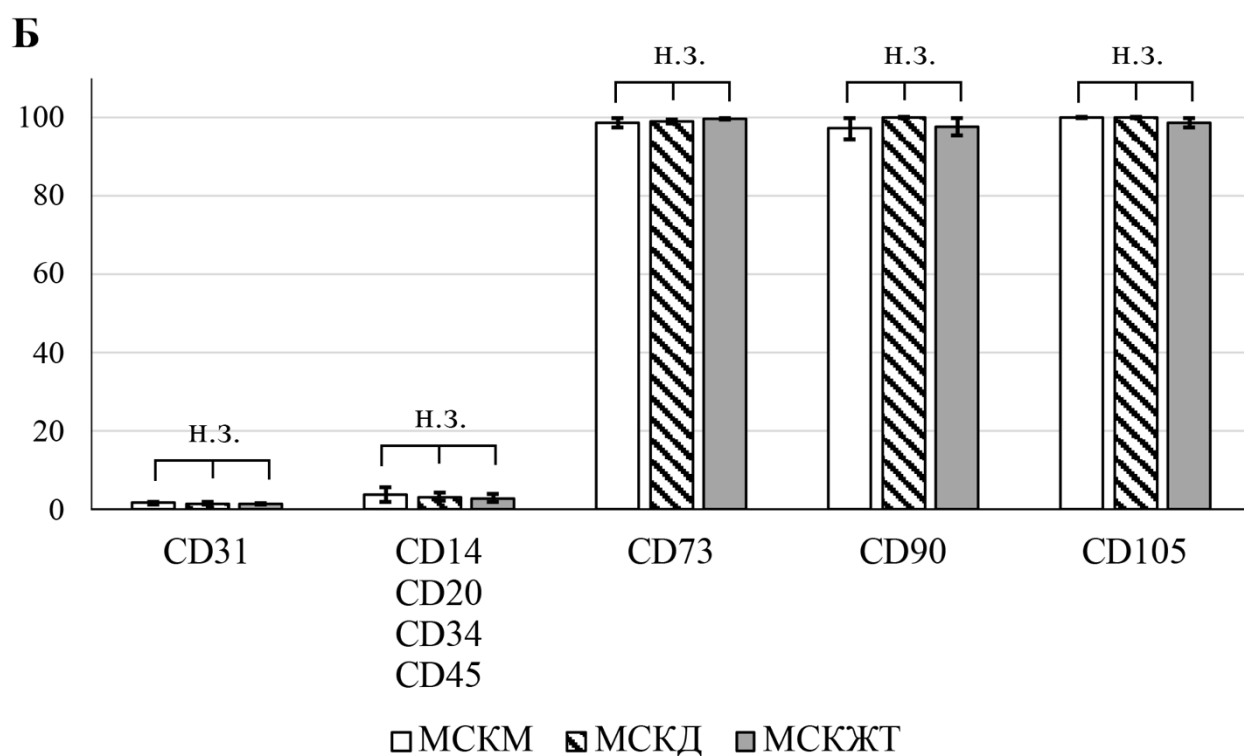
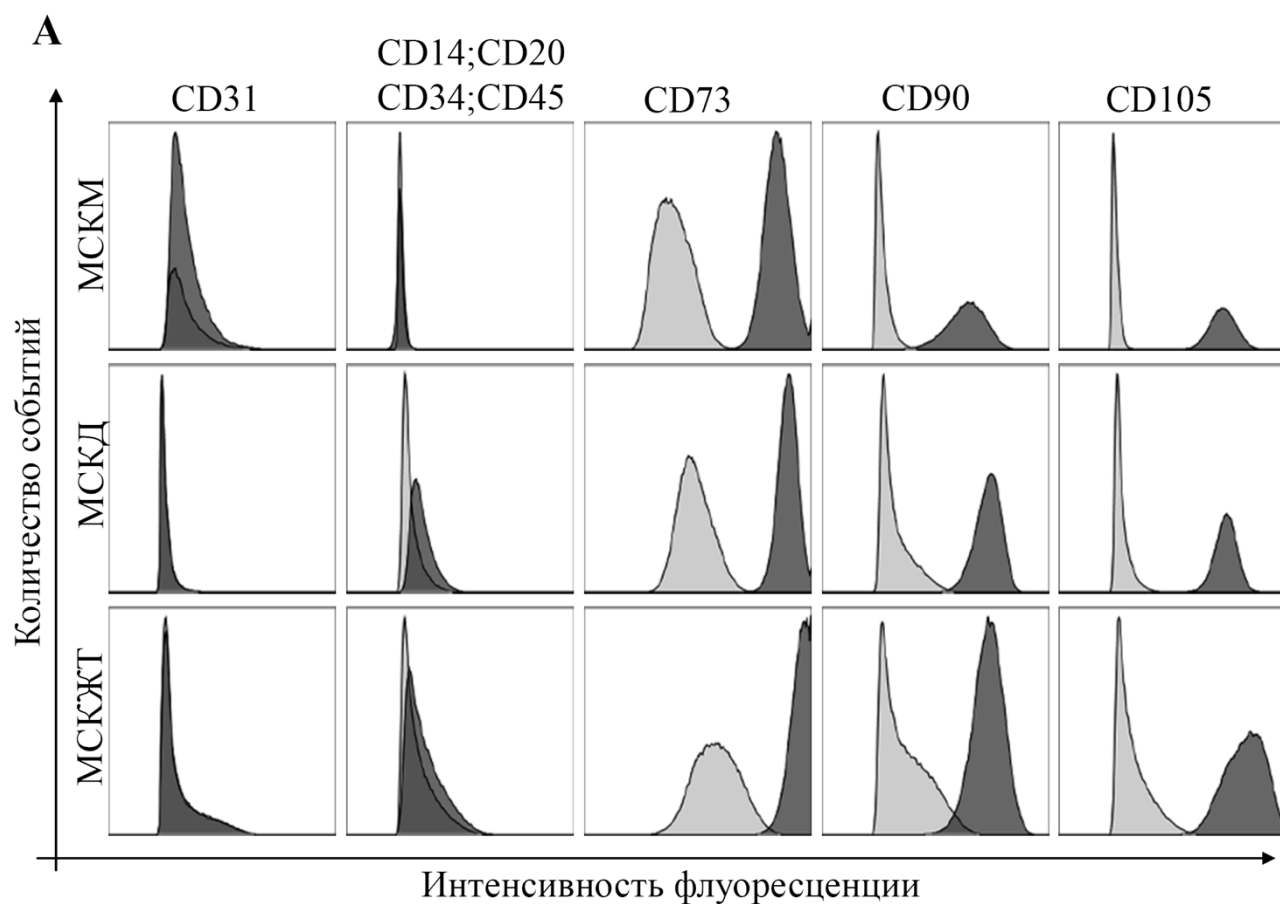


Рисунок 1. Иммунофенотип МСК, выделенных из менструального отделяемого, дермы и жировой ткани **А**. Результаты одного повтора проточной цитометрии.

Черным показано распределение интенсивности флуоресцентного сигнала от клеток, меченных специфическими антителами, серым – меченных соответствующими контрольными изотипическими антителами. **Б.** Сравнительный анализ относительной представленности 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 ($p>0,05$).

Индукцию адипогенной, остеогенной и хондрогенной дифференцировки проводили на 4-5 пассажах одновременно для всех исследуемых культур (рис. 2).

Результаты адипогенной дифференцировки оценивали на 14 сутки. Её характер не был тотальным, поскольку только часть клеток в каждом образце содержала жировые капли, обнаруживаемые после окраски масляным красным. Обращало на себя внимание наличие крупных жировых капель в культурах МСКД и МСКЖТ, что свидетельствовало о более выраженной степени дифференцировки, чем у МСКМ, в культурах которых не обнаруживалось столь же крупных капель.

Результаты остеогенной и хондрогенной дифференцировок оценивали на 21 сутки. При остеогенной дифференцировке образовывались минеральные депозиты близкой к шаровидной формы, хорошо удерживающие ализариновый красный при дополнительных отмывках. При визуальной оценке препаратов было отмечено, что в культурах МСКД и МСКЖТ они достигали наибольших размеров.

Перед индукцией хондрогенной дифференцировки из исследуемых МСК предварительно формировали сфероиды, для чего использовали одинаковое количество клеток. По окончании периода культивирования обнаружилось, что пробирки с МСКМ содержали сфероиды визуально меньшего размера, чем в случае МСКД и МСКЖТ. В то же время все полученные после криотомии срезы специфически окрашивались альциановым синим, что свидетельствовало об успешности дифференцировки.

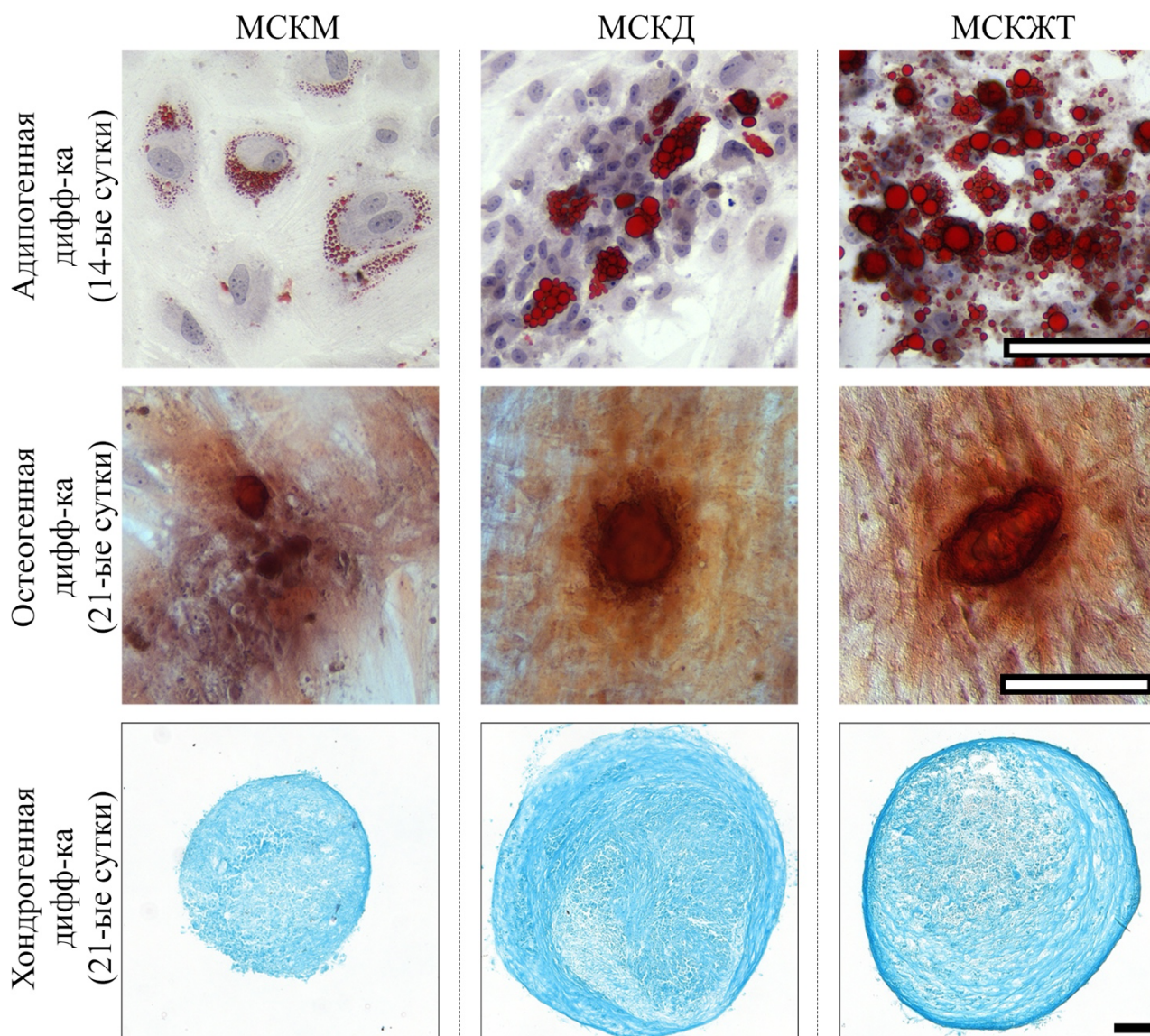


Рисунок 2. МСК, выделенные из менструального отделяемого, дермы и жировой ткани, способны к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях *in vitro*. Жировые капли окрашены масляным красным, минеральные отложения – ализариновым красным, гликозамингликаны – альтиановым синим. Световая микроскопия. Масштабный отрезок 100 мкм.

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.

3.2. Исследование способности МСКМ, МСКД и МСКЖТ к фиброплазии и фенотипическому переходу в миофибробласты *in vitro*

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. 3). Попытки сформировать клеточный пласт из МСКМ путем их высаживания на пластик высокой плотности также не приводили к ожидаемому результату. Таким образом, в стандартных условиях культивирования МСКМ обладали тканеспецифичной устойчивостью к фиброплазии.

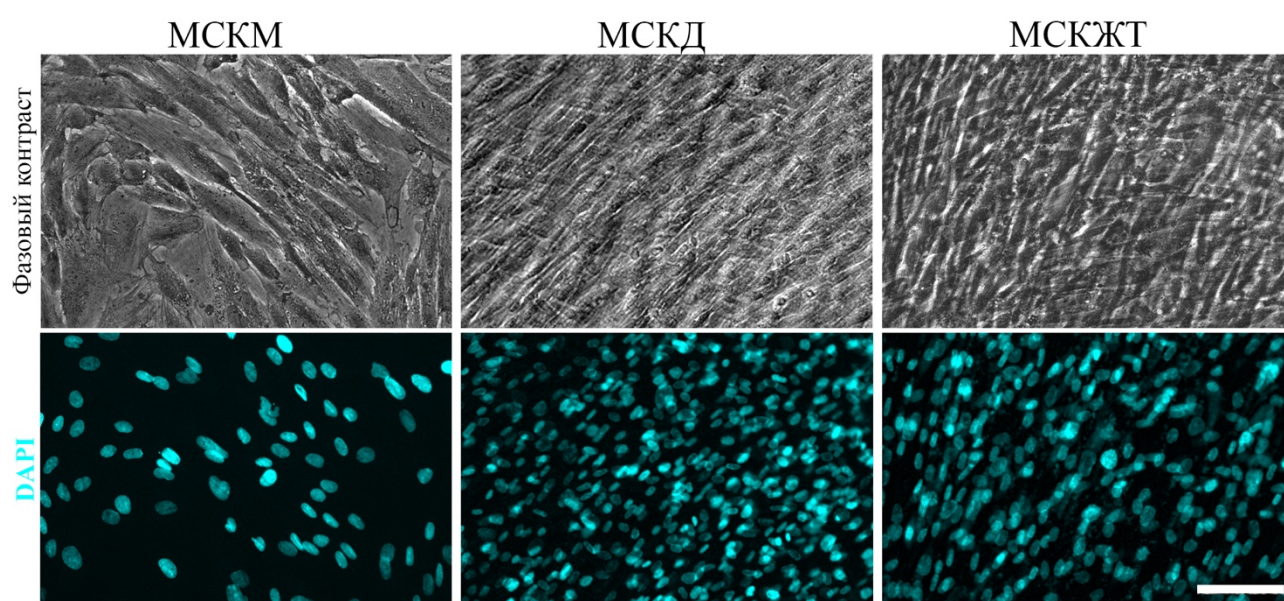


Рисунок 3. МСКМ устойчивы к фиброплазии *in vitro*. Клеточные пласты в культурах МСКД и МСКЖТ, но не МСКМ, на 14 день культивирования без пассирования. Ядра помечены DAPI. Масштабный отрезок 100 мкм.

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* [69,

92]. В качестве исследуемой мишени мы остановились на SMAD2, поскольку фосфорилирование данного белка подтверждает факт сборки и активации рецепторного комплекса [92].

Во всех исследуемых культурах, в том числе в МСКМ, мы обнаружили индуцированное ТФР-β1 увеличение содержания фосфорилированного SMAD2 (pSMAD2) (табл. 3; рис. 4, А). Статистически значимые различия при оценке по 3 донорам были показаны для МСКМ и МСКД (рис. 4, 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.

Таблица 3. Денситометрический анализ результатов иммуноблоттинга, указывающий на повышение уровня pSMAD2 под действием ТФР-β1 в исследуемых культурах МСК.

	МСКМ	МСКД	МСКЖТ
	Среднее ± стандартное квадратичное отклонение, кратность изменения		
<i>pSMAD:</i> <u>96 часов с ТФР-β1</u> 96 часов с БСА	10,4 ± 1,5	7,3 ± 2,7	9,2 ± 7,0

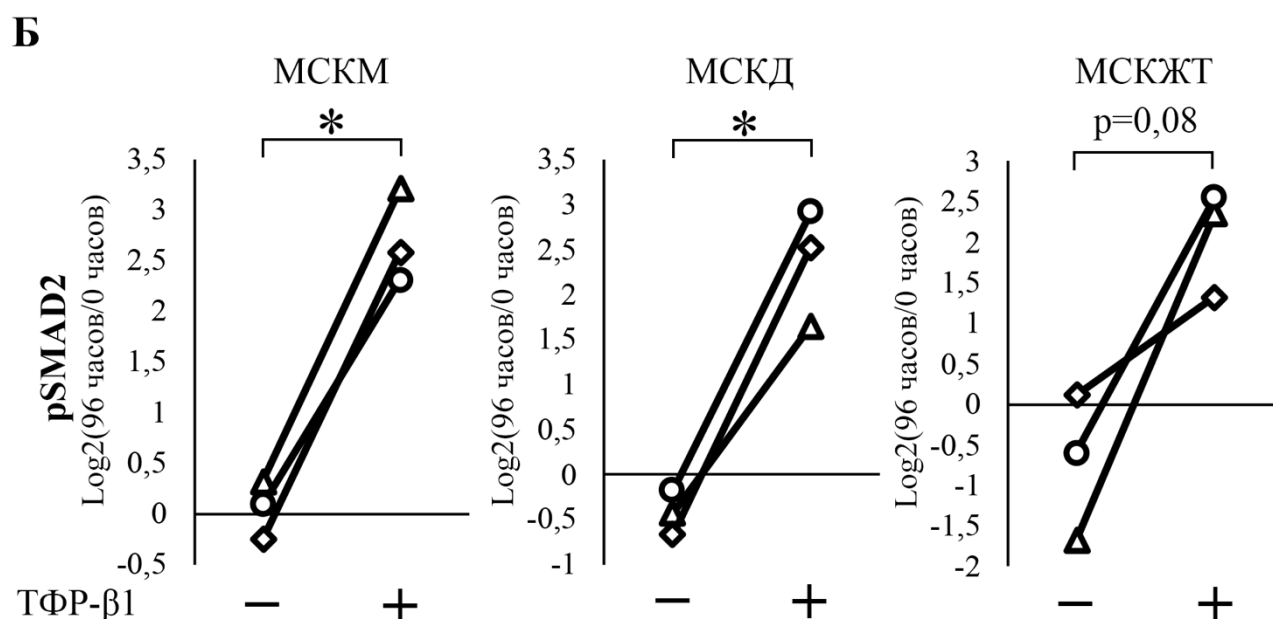
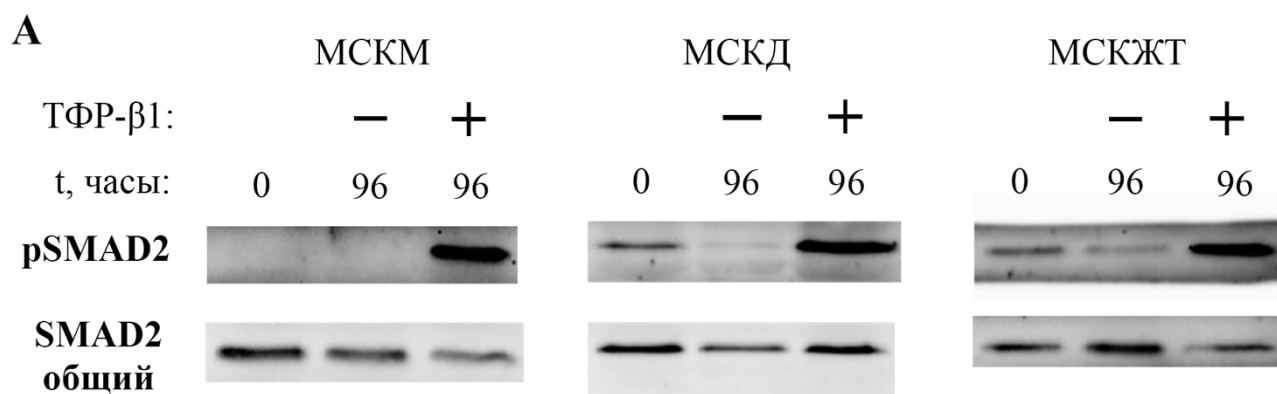


Рисунок 4. ТФР-β1 активирует фосфорилирование SMAD2 в МСКМ, МСКД и МСКЖТ. **А.** Репрезентативные результаты иммуноблоттинга лизатов МСКМ, МСКД и МСКЖТ, полученных до начала эксперимента (дорожка «0») и через 96 часов культивирования с добавлением БСА (дорожка «-/96») или ТФР-β1 (дорожка «+/96»). **Б.** 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.

На основе подтвержденной чувствительности всех исследуемых культур к ТФР-β1 мы могли ожидать сопоставимых изменений в отношении маркеров

миофибробластов, а в случае выявления выраженных отличий между исследуемыми МСК, считать их обусловленными тканеспецифичными свойствами данных клеток.

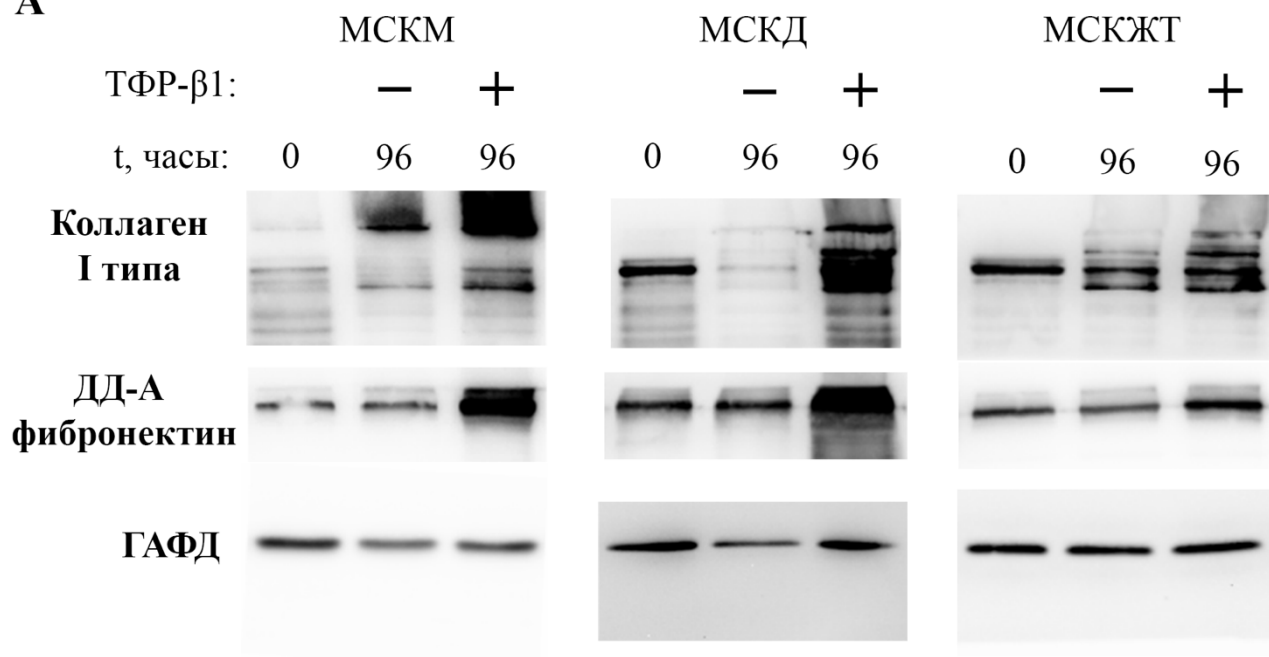
Оценка продукции и депонирования белков ВКМ в культурах МСКМ, МСКД, МСКЖТ под действием ТФР-β1. ДД-А фибронектин и коллаген I типа являются одними из основных белков ВКМ – маркеров миофибробластов, продукция которых усиливается под действием ТФР-β1 в культурах МСК при моделировании *in vitro* соответствующего фенотипического перехода [20].

В нашей модели оценка изменения содержания данных белков производилась при помощи иммуноблоттинга, а верификация их депонирования во внеклеточном пространстве – при помощи иммунофлуоресценции. 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 (табл. 4; рис. 5). Для МСКД и МСКЖТ была обнаружена сходная, но слабо выраженная тенденция.

Таблица 4. Денситометрический анализ результатов иммуноблоттинга, указывающий на повышение уровня коллагена I типа и ДД-А фибронектина под действием ТФР-β1 в исследуемых культурах МСК.

	МСКМ	МСКД	МСКЖТ
	Среднее ± стандартное квадратичное отклонение, кратность изменения		
<i>Коллаген I типа:</i> <u>96 часов с ТФР-β1</u> 96 часов с БСА	2,53 ± 0,13	5,66 ± 3,41	2,01 ± 0,43
<i>ДД-А фибронектин:</i> <u>96 часов с ТФР-β1</u> 96 часов с БСА	3,86 ± 0,48	2,01 ± 0,90	1,84 ± 1,03

А



Б

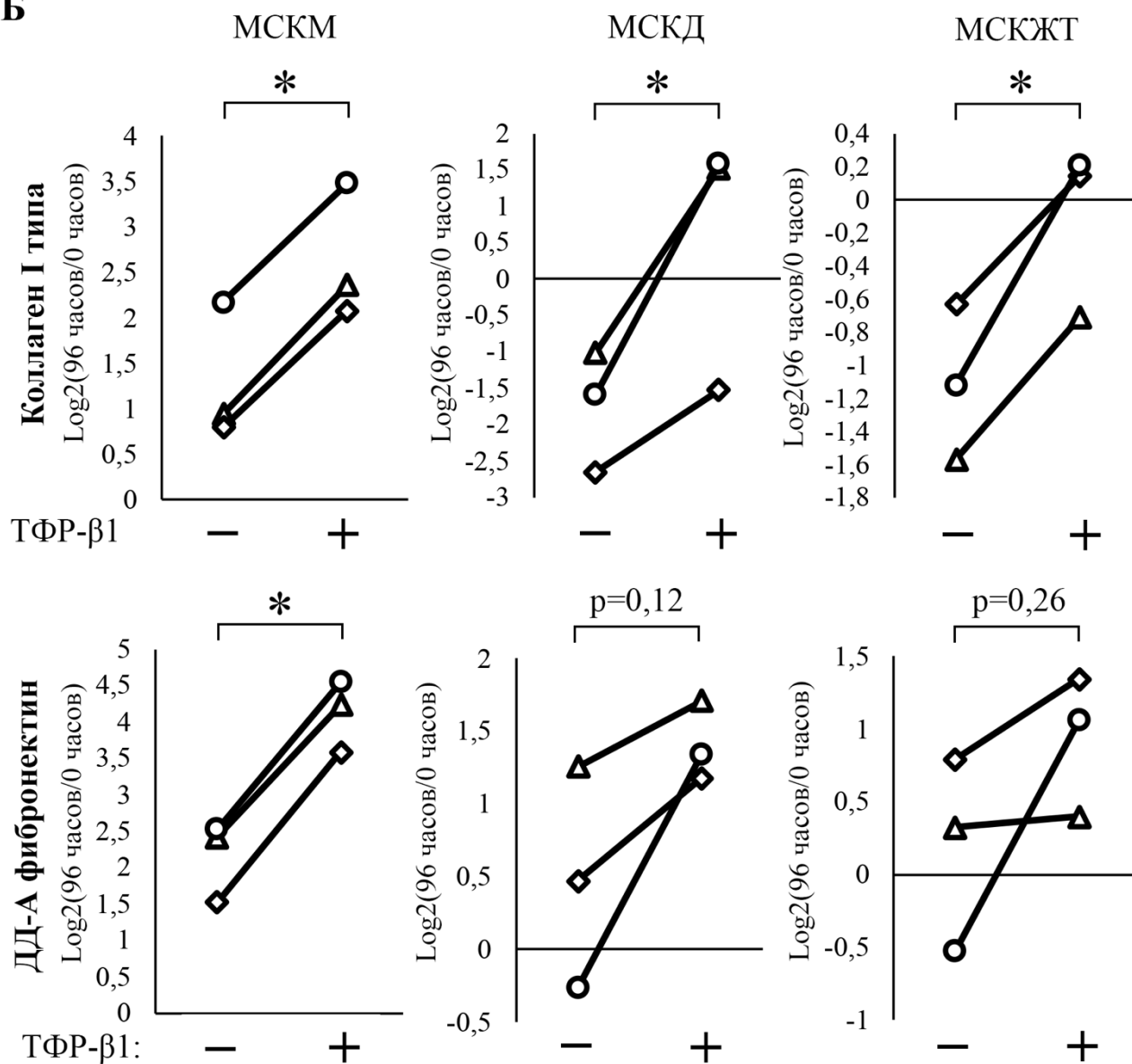


Рисунок 5. ТФР-β1 увеличивает содержание коллагена I типа и ДД-А фибронектина в культурах МСКМ, МСКД и МСКЖТ. А. Репрезентативные результаты иммуноблоттинга лизатов МСКМ, МСКД и МСКЖТ, полученных до начала эксперимента (дорожка «0») и через 96 часов культивирования с добавлением БСА (дорожка «-/96») 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.

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 6, А). Вместе с тем, анализируя паттерн депонирования белков ВКМ, мы выявили в культурах МСКМ значимо бóльшую колокализацию коллагена I типа и ДД-А фибронектина (табл. 5; рис. 6, Б).

Таблица 5. Степень колокализации коллагена I типа и ДД-А фибронектина в исследуемых культурах МСК.

	МСКМ	МСКД	МСКЖТ
	Среднее ± стандартное квадратичное отклонение, коэффициент корреляции Пирсона		
96 часов с БСА	0,797 ± 0,006	0,532 ± 0,078	0,473 ± 0,155
96 часов с ТФР-β1	0,710 ± 0,078	0,593 ± 0,025	0,527 ± 0,090

Таким образом, с точки зрения изменения продукции коллагена I типа и ДД-А фибронектина ответ МСКМ на ТФР-β1 был сопоставимым с другими исследуемыми МСК, однако он был тканеспецифичен с точки зрения организации этих белков во внеклеточном пространстве. Данная тканеспецифичная особенность наблюдалась и в отсутствие ТФР-β1.

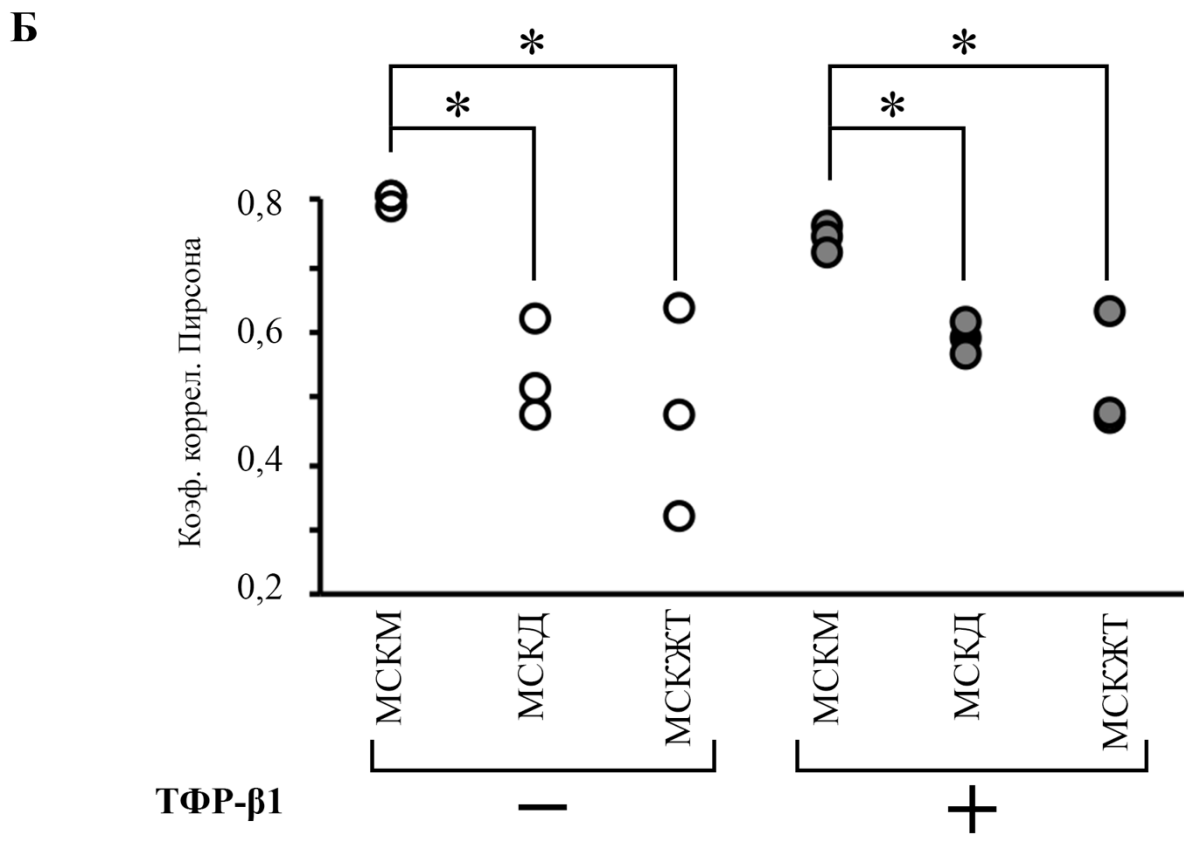
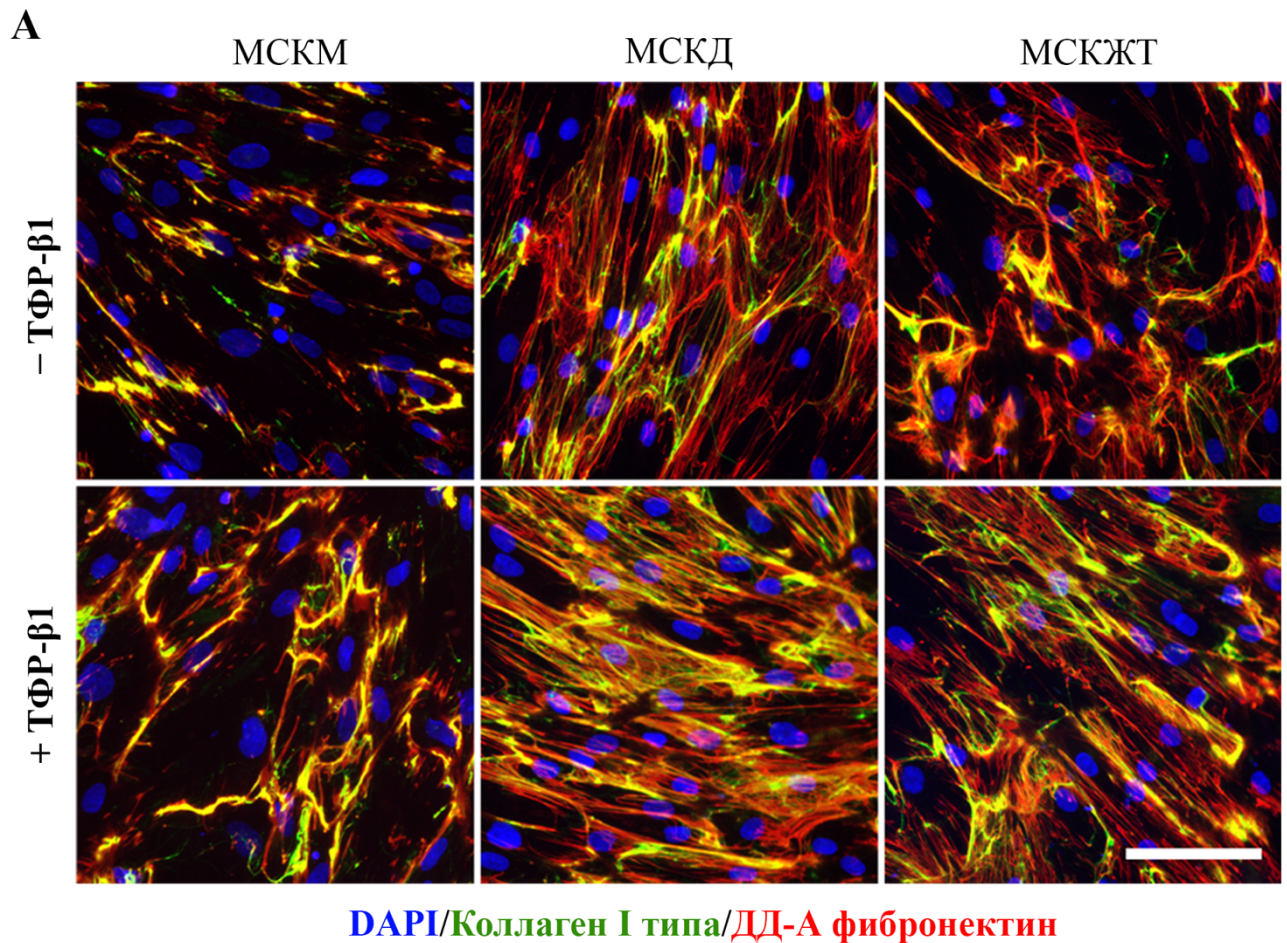


Рисунок 6. МСКМ проявляют тканеспецифичные особенности организации ВКМ независимо от действия ТФР- β 1. А. Иммунофлуоресцентное мечение коллагена I типа и ДД-А фибронектина в культурах МСКМ, МСКД и МСКЖТ. Ядра помечены DAPI; масштабный отрезок 100 мкм. Б. Степень колокализации коллагена I типа и ДД-А 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; $n=3$ * $p<0,05$.

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* [20, 92]. Включаясь затем в состав фибриллярного актина, α -ГМА становится частью сократительного аппарата, сообщаящегося посредством винкулина с контактами фокальной адгезии, а через них – с ВКМ. Важно отметить, что для фенотипического перехода в миофибробласты характерно не увеличение содержания винкулина в клетке, а его перераспределение и скопление в виде кластеров на концах актиновых фибрилл [95].

Методом иммуноблоттинга мы обнаружили, что действие ТФР- β 1 вызывало увеличение уровня α -ГМА во всех исследуемых культурах МСК (табл. 6). Значимые изменения уровня α -ГМА по 3 донорам были выявлены для МСКД и МСКМ, в то время как для МСКЖТ показана только тенденция (рис. 7). 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.

Таблица 6. Денситометрический анализ результатов иммуноблоттинга, указывающий на повышение уровня α -ГМА под действием ТФР- β 1 в исследуемых культурах МСК.

	МСКМ	МСКД	МСКЖТ
	Среднее \pm стандартное квадратичное отклонение, кратность изменения		
<i>α-ГМА:</i> 96 часов с ТФР- β 1 96 часов с БСА	1,6 \pm 0,33	8,8 \pm 3,3	2,9 \pm 2,4

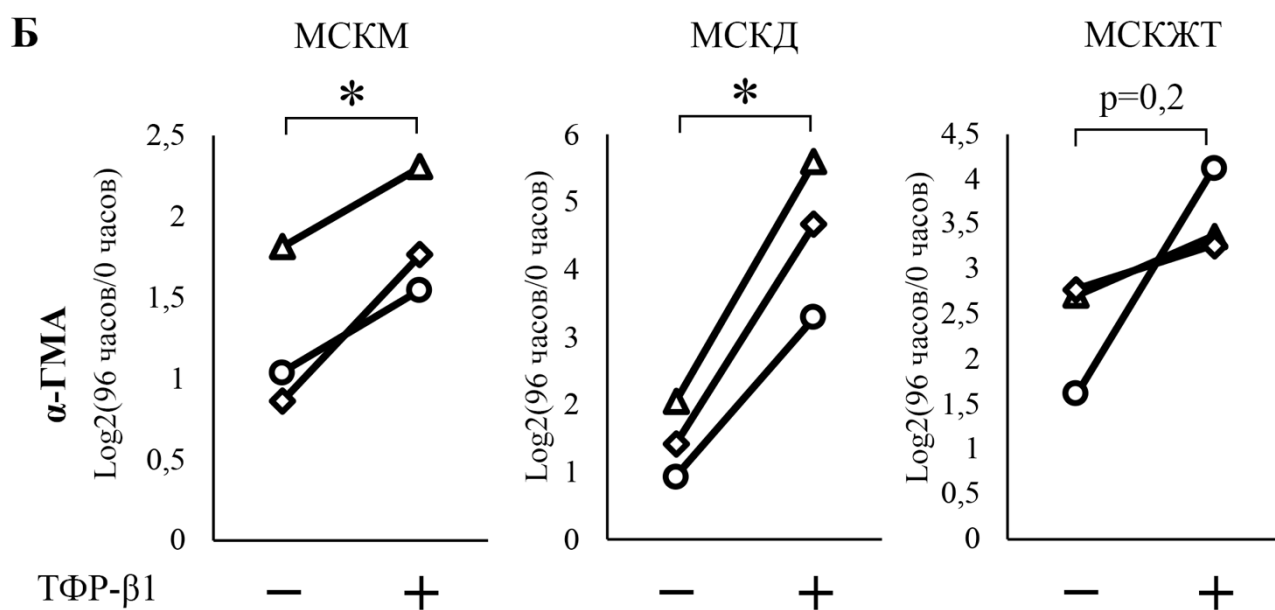
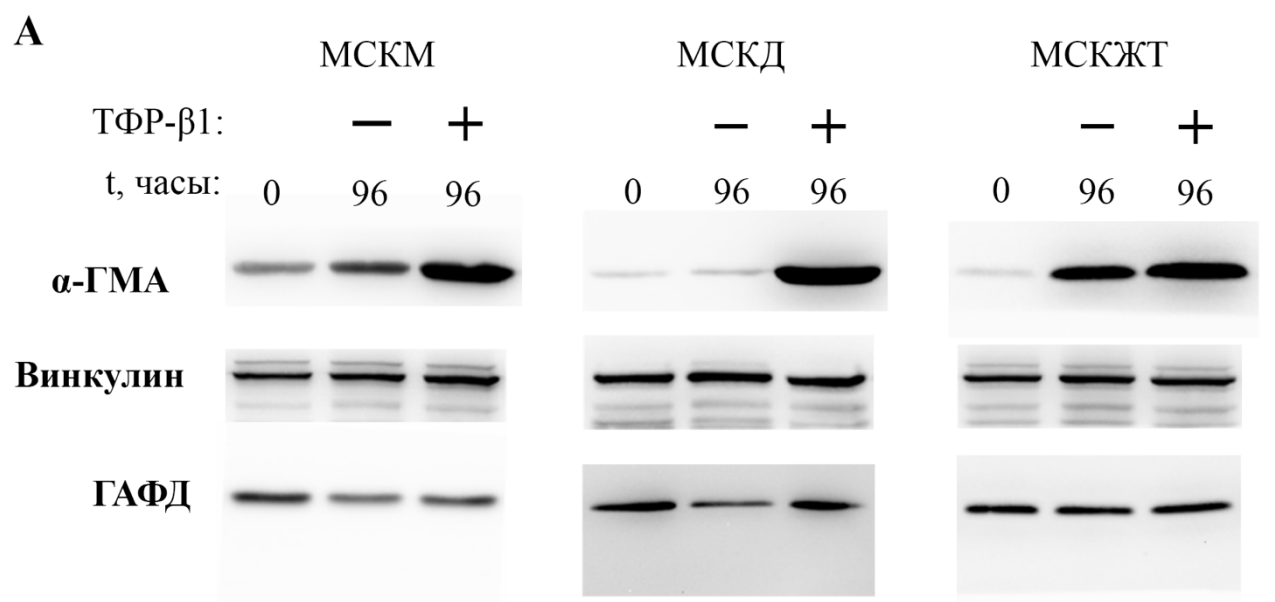


Рисунок 7. ТФР-β1 увеличивает содержание α-ГМА в культурах МСКМ, МСКД и МСКЖТ. **А.** Репрезентативные результаты иммуноблоттинга лизатов МСКМ, МСКД и МСКЖТ, полученных до начала эксперимента (дорожка «0») и через 96 часов культивирования с добавлением БСА (дорожка «-/96») или ТФР-β1 (дорожка «+/96»). **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.

При иммунофлуоресцентном анализе обращало на себя внимание появление множества α-ГМА положительных стресс-фибрилл во всех исследуемых культурах, находившихся под действием ТФР-β1 (рис. 8, А). 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 контрольных образцах МСКМ и МСКЖТ они присутствовали. Кроме того, под действием ТФР-β1 происходило перераспределение винкулина с образованием его выраженных кластеров во всех исследуемых культурах (рис. 8, Б). Вместе с тем взаимное расположение α-ГМА и винкулина было характерным для фенотипа миофибробластов (рис. 9).

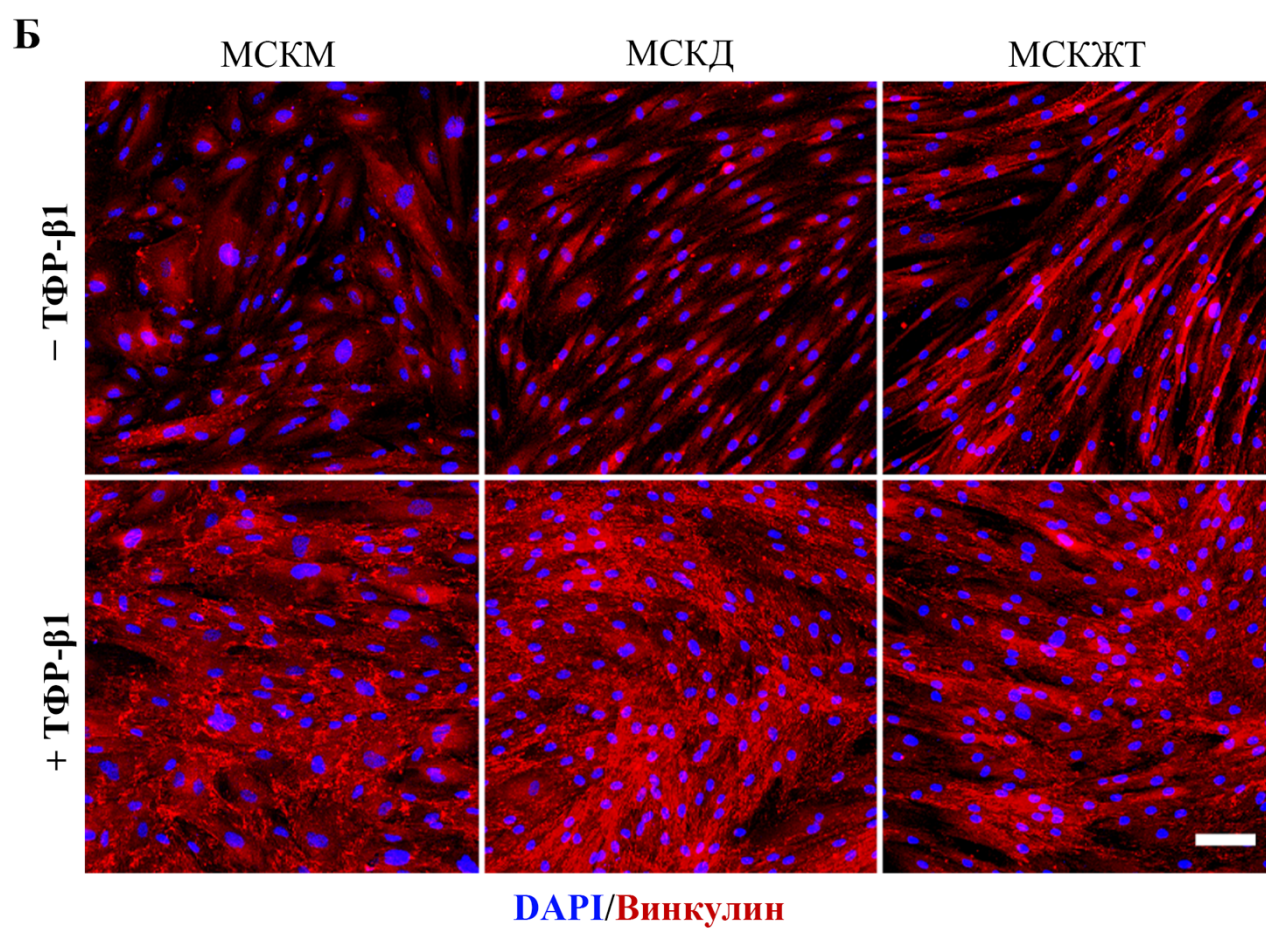
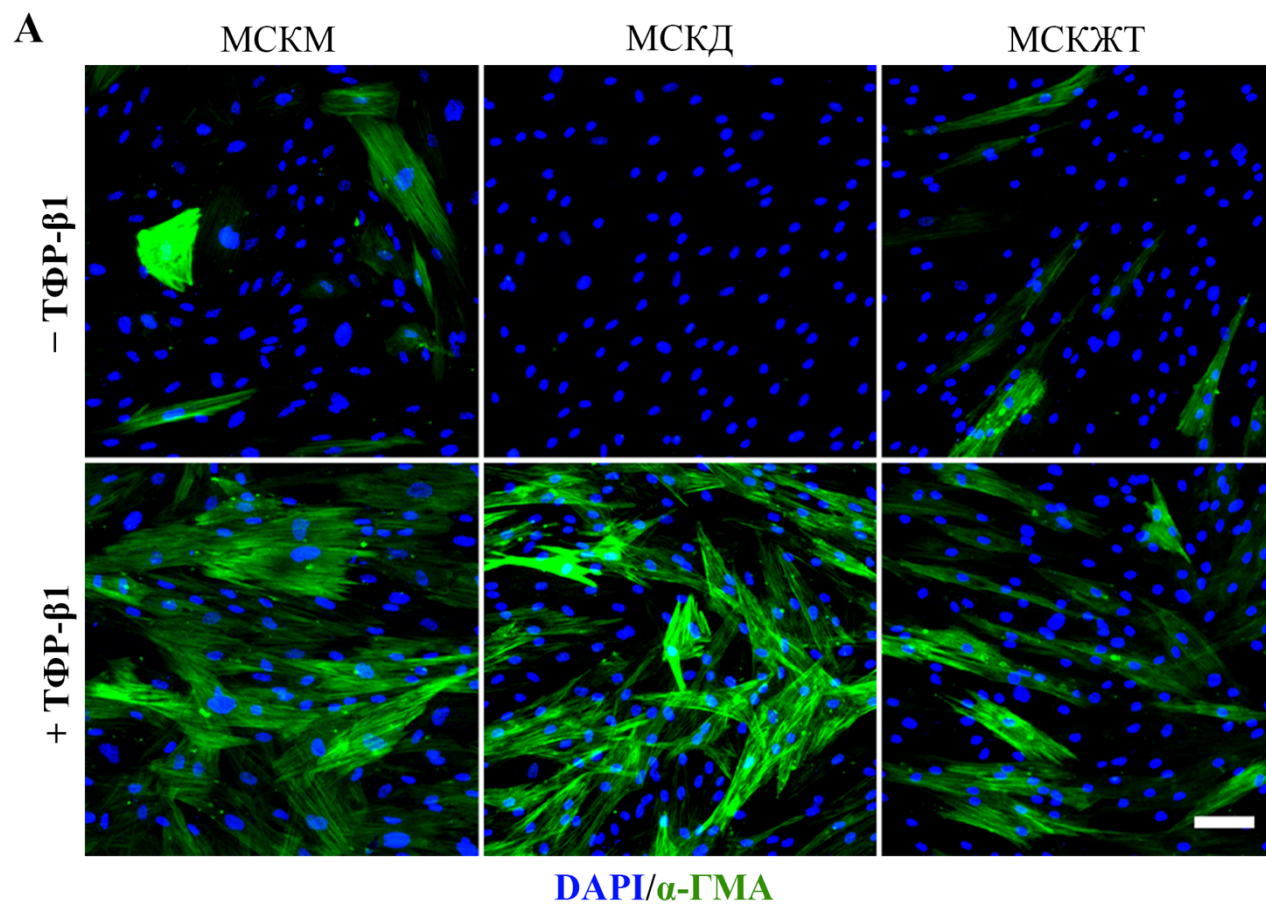


Рисунок 8. ТФР-β1 способствует появлению α-ГМА позитивных стресс-фибрилл и кластеров винкулина в культурах МСК. А. Иммунофлуоресцентное мечение α-ГМА в МСКМ, МСКД и МСКЖТ, культивированных с добавлением БСА или ТФР-β1. Б. Иммунофлуоресцентное мечение винкулина в МСКМ, МСКД и МСКЖТ, культивированных с добавлением БСА или ТФР-β1. Масштабный отрезок 100 мкм; ядра помечены DAPI.

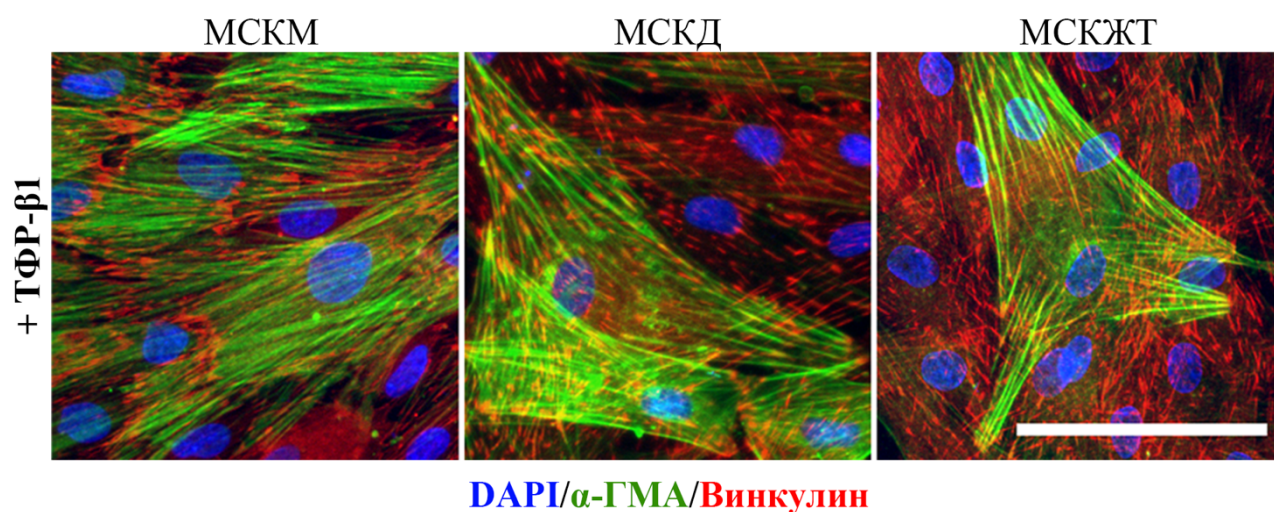


Рисунок 9. Характерное для миофибробластов взаимное расположение α-ГМА и винкулина в культурах МСКМ, МСКД и МСКЖТ. Масштабный отрезок 100 мкм; ядра помечены DAPI.

Функциональность сократительного фенотипа, приобретаемого исследуемыми МСК под действием ТФР-β1, оценивали в модели контракции флотирующего диска из свиного коллагена с заключенными в нём клетками. Пробные эксперименты выявили, что параметром, определяющим применимость данной модели, является оптимальное количество МСК, находящихся в толще диска. В то же время мы обнаружили, что для клеток, полученных от разных доноров, это оптимальное количество может различаться. Чтобы учесть данную особенность в окончательных экспериментах, мы использовали диапазон концентраций от $40 \cdot 10^3$ до $160 \cdot 10^3$ клеток на диск.

Оказалось, что все исследованные МСК контрактировали коллагеновый диск без добавления ТФР-β1, при этом для МСКМ было отмечено наибольшее сокращение площади диска (рис. 10, А). Специфичность обнаруженной контракции не вызывала сомнений, поскольку контрольные диски без клеток либо с клетками эндотелия пуповины человека не изменяли своего размера. Значимое усиление контракции под влиянием ТФР-β1 было обнаружено только для МСКД (рис. 10, Б).

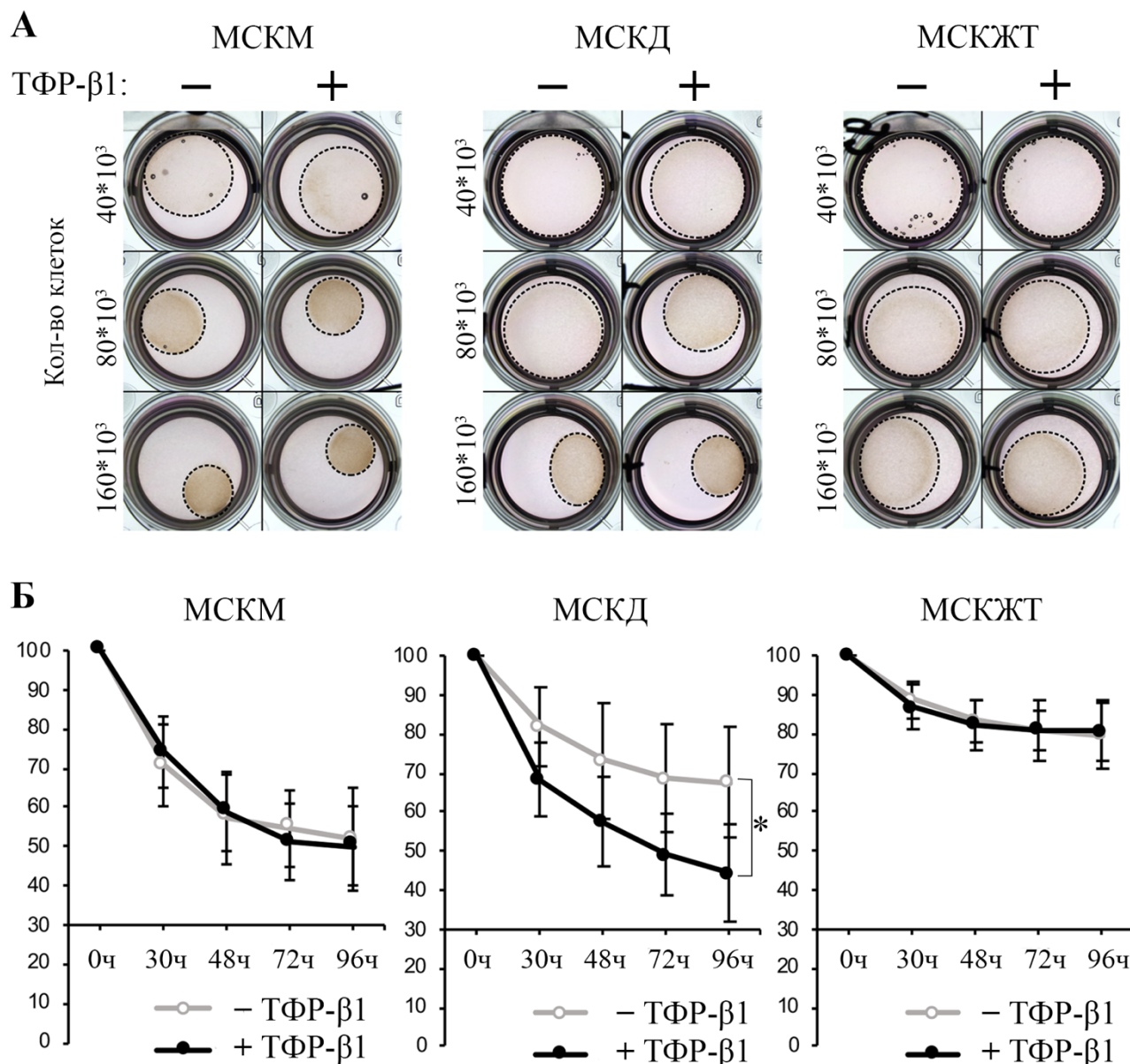


Рисунок 10. Контракция коллагенового диска МСКМ, МСКД и МСКЖТ. А. Репрезентативные изображения коллагеновых дисков с заключенными в них МСК с добавлением БСА или ТФР-β1. Фотографии получены через 48 часов после начала эксперимента. Б. Сравнение динамики контракции коллагеновых дисков МСКМ, МСКД и МСКЖТ под действием БСА или ТФР-β1. Размер диска (%)

определен относительно размера лунки. При статистическом анализе использовали t-критерий для зависимых выборок; $n=3$, $*p<0,05$.

Вероятно, чувствительности используемой модели не хватило для обнаружения аналогичного, но менее выраженного эффекта в дисках с МСКМ и МСКЖТ. Это подтверждалось наличием отдельных экспериментальных точек (преимущественно с высоким содержанием клеток в дисках), где наблюдалась ожидаемая, хотя и слабо выраженная разница, однако общая вариабельность численных оценок нивелировала их вклад. Дополнительным подтверждением данного предположения служат результаты оценки сократительного фенотипа методом иммунофлуоресценции, где только у МСКД практически отсутствовали α -ГМА положительные стресс-фибриллы в контрольных образцах (рис. 8, А).

Резюмируя полученные результаты, можно утверждать, что МСКМ *in vitro* не предрасположены к фиброплазии, но способны совершать фенотипический переход в миофибробласты. Вместе с тем МСКМ обладают тканеспецифичным характером колокализации белков ВКМ, который не изменяется под действием ТФР- β 1.

3.3. Исследование действия растворимых факторов, образующихся в эндометрии в ходе менструации, в отношении фиброплазии и фенотипического перехода МСК в миофибробласты *in vitro*

Для решения поставленной задачи мы сравнивали действие на культуры МСКМ, МСКД и МСКЖТ сыворотки менструального отделяемого (СМО), содержащей как локально продуцируемые в эндометрии факторы, так и системные гуморальные стимулы, и сыворотки периферической крови (СПК), содержащей только системные гуморальные стимулы. 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- β 1 в растворах используемых сывороток. Концентрация ТФР- β 1 в 10% СМО составила $9,3\pm 0,57$ нг/мл, а в 10% СПК равнялась $4,9\pm 0,15$ нг/мл (рис. 12, Б), 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 (табл. 7; рис. 11). Уровень винкулина также снижался в МСКМ и МСКЖТ, но не в МСКД, что было несколько неожиданным результатом ввиду существующих представлений о винкулине как о достаточно надежном белке контроля загрузки. Для того, чтобы дополнительно убедиться в достоверности этих данных, мы измерили концентрацию ДНК в исследуемых лизатах и обнаружили, что она лучше коррелировала именно с уровнем ГАФД, использованным нами в качестве контроля загрузки, а не с уровнем винкулина.

Таблица 7. Денситометрический анализ результатов иммуноблоттинга, указывающий на снижение уровня α -ГМА под действием РФМ в исследуемых культурах МСК.

	МСКМ	МСКД	МСКЖТ
	Среднее \pm стандартное квадратичное отклонение, кратность изменения		
<i>α-ГМА:</i> <u>96 часов с СМО</u> 96 часов с ФБС	0,226 \pm 0,031	0,007 \pm 0,006	0,109 \pm 0,033
<i>α-ГМА:</i> <u>96 часов с СПК</u> 96 часов с ФБС	1,297 \pm 0,457	0,703 \pm 0,673	0,509 \pm 0,041

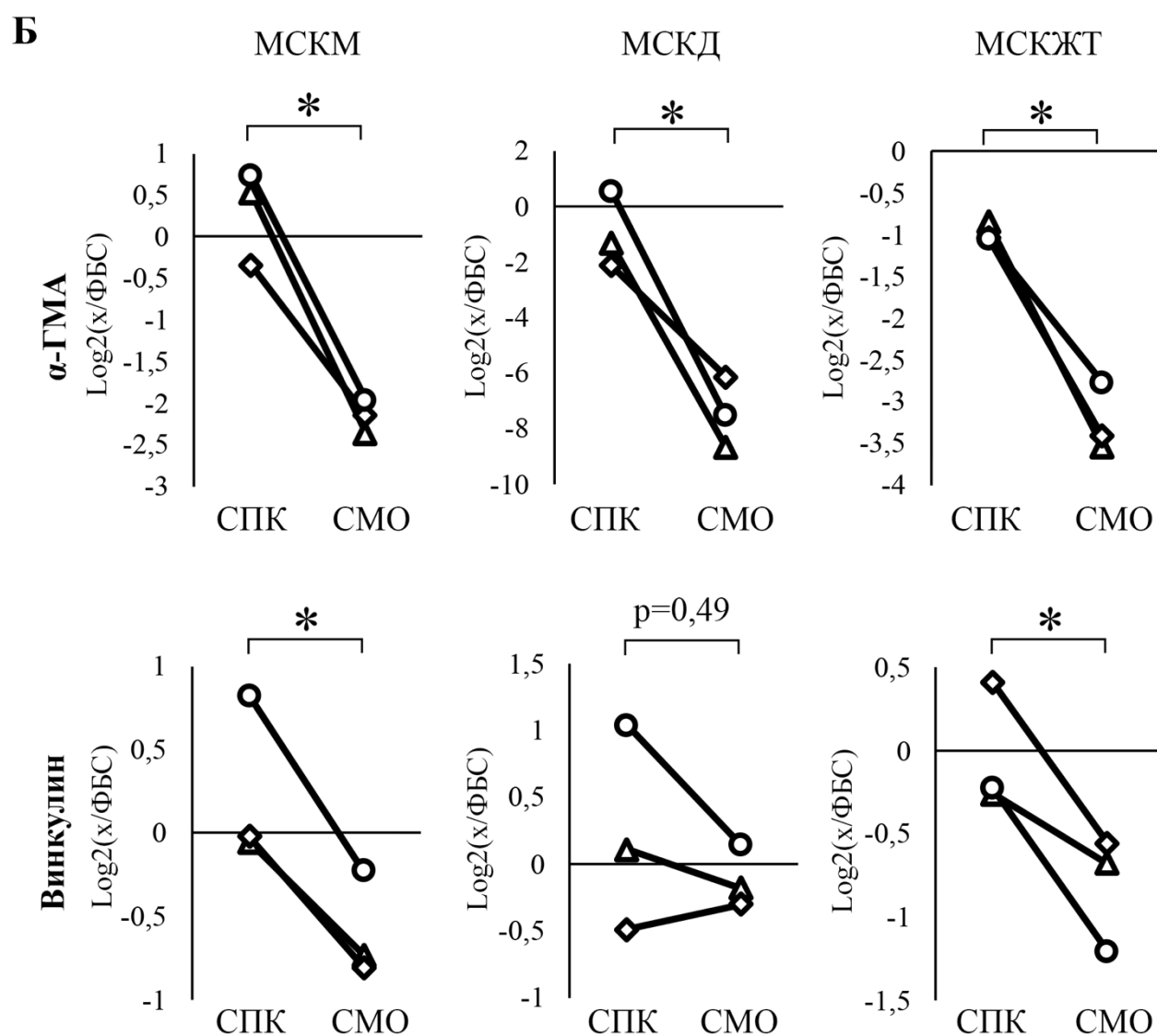
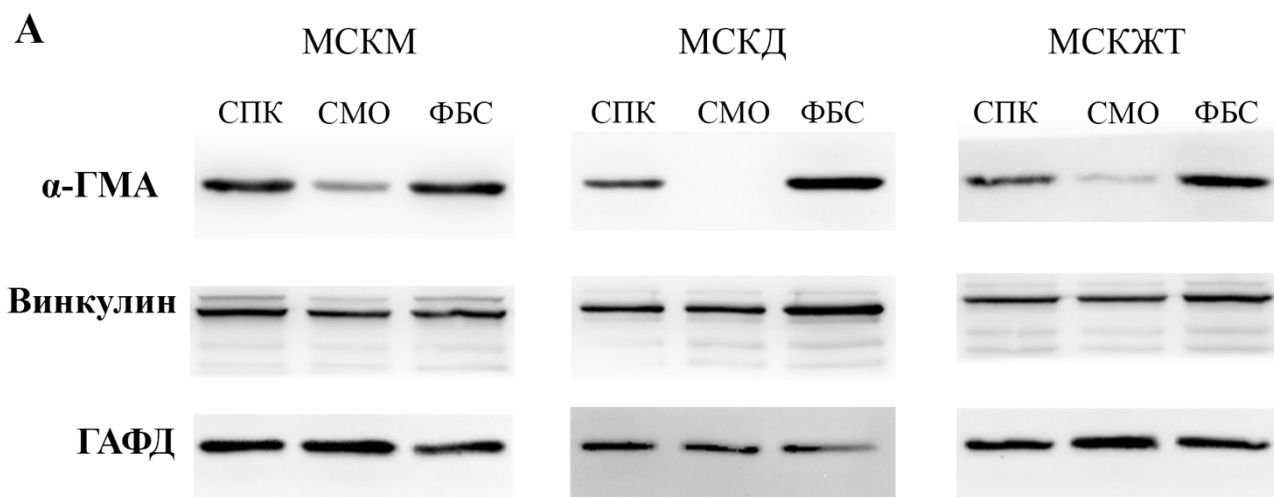


Рисунок 11. Влияние РФМ на содержание α -ГМА и винкулина в культурах МСКМ, МСКД и МСКЖТ. А. Репрезентативные результаты иммуноблоттинга тотальных лизатов, полученных через 96 часов культивирования исследуемых

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; $n=3$, $*p<0,05$.

При иммунофлуоресцентном анализе мы визуально обнаружили 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. 12, А).

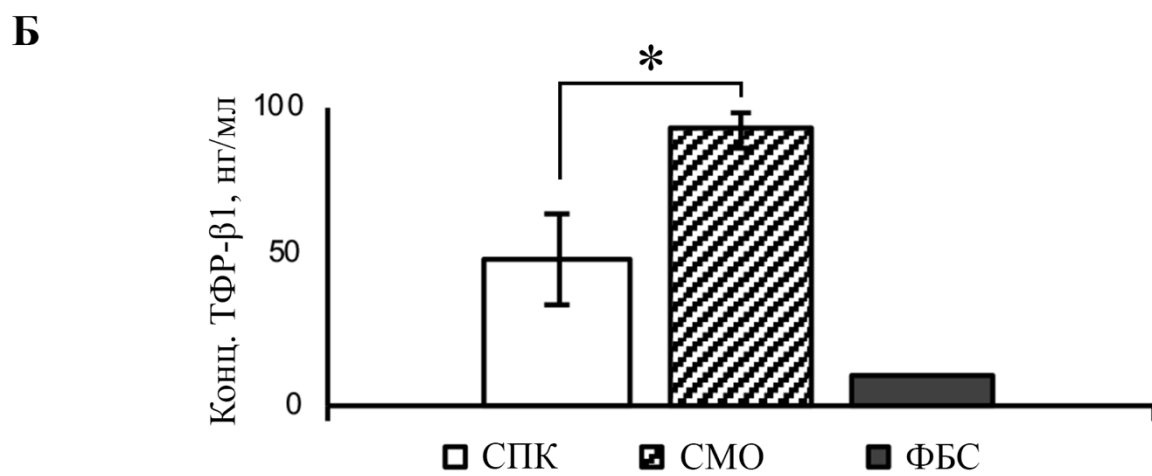
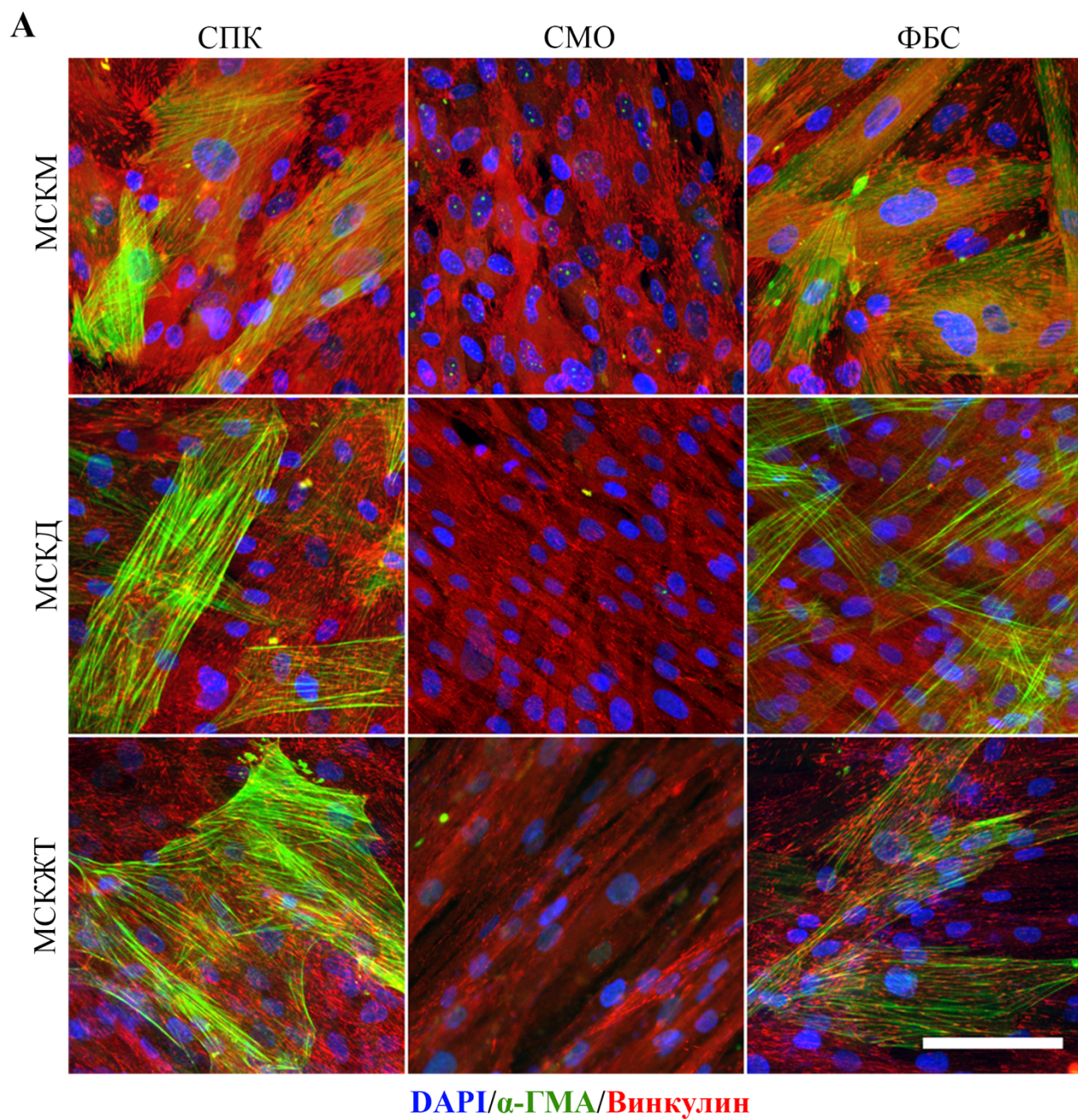


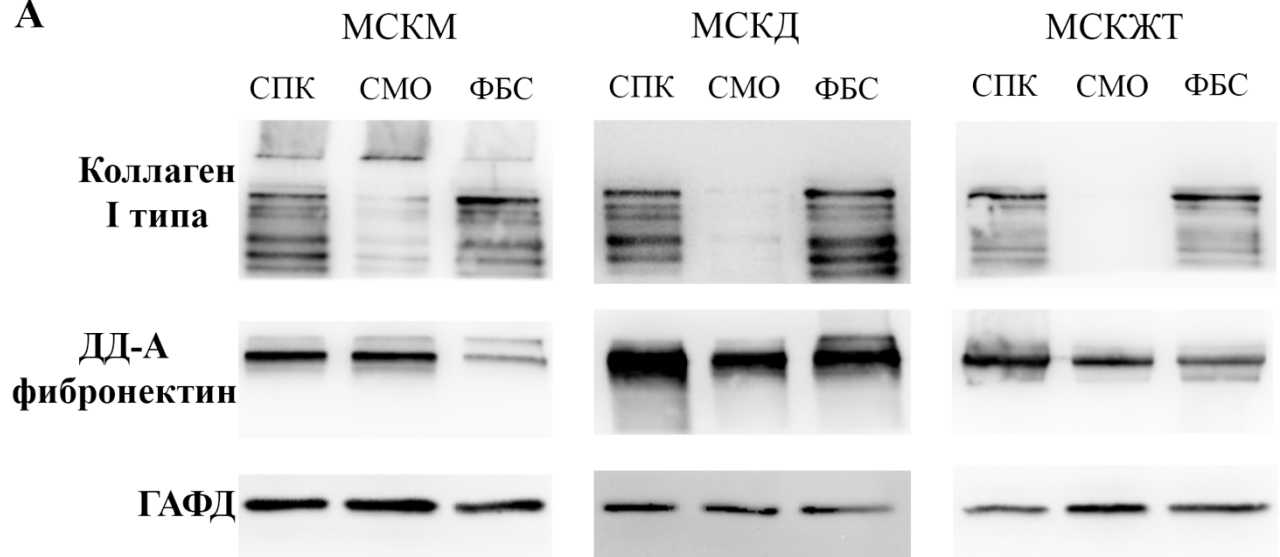
Рисунок 12. РФМ подавляют приобретение контрактильного фенотипа МСКМ, МСКД и МСКЖТ. А. Иммунофлуоресцентное мечение α -ГМА и винкулина в МСК через 96 часов культивирования с 10% СПК, СМО или ФБС; масштабный отрезок 100 мкм; ядра помечены DAPI. Б. Концентрация ТФР- β 1 в СМО, СПК и ФБС, определенная методом 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 \approx 130 кДа) в культурах МСКМ и МСКЖТ (табл. 8; рис. 13). 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 наблюдалась похожая, но еще менее выраженная тенденция.

Таблица 8. Денситометрический анализ результатов иммуноблоттинга, указывающий на снижение уровня коллагена I типа и ДД-А фибронектина под действием РФМ в исследуемых культурах МСК.

	МСКМ	МСКД	МСКЖТ
	Среднее \pm стандартное квадратичное отклонение, кратность измерения		
<i>Коллаген I типа:</i> <u>96 часов с СМО</u> <u>96 часов с ФБС</u>	0,23 \pm 0,18	0,29 \pm 0,16	0,06 \pm 0,03
<i>Коллаген I типа:</i> <u>96 часов с СПК</u> <u>96 часов с ФБС</u>	0,75 \pm 0,48	3,12 \pm 3,56	1,03 \pm 0,30
<i>ДД-А фибронектин:</i> <u>96 часов с СМО</u> <u>96 часов с ФБС</u>	1,87 \pm 0,86	1,06 \pm 0,53	0,75 \pm 0,23
<i>ДД-А фибронектин:</i> <u>96 часов с СПК</u> <u>96 часов с ФБС</u>	2,49 \pm 0,95	5,19 \pm 6,57	1,69 \pm 0,70

А



Б

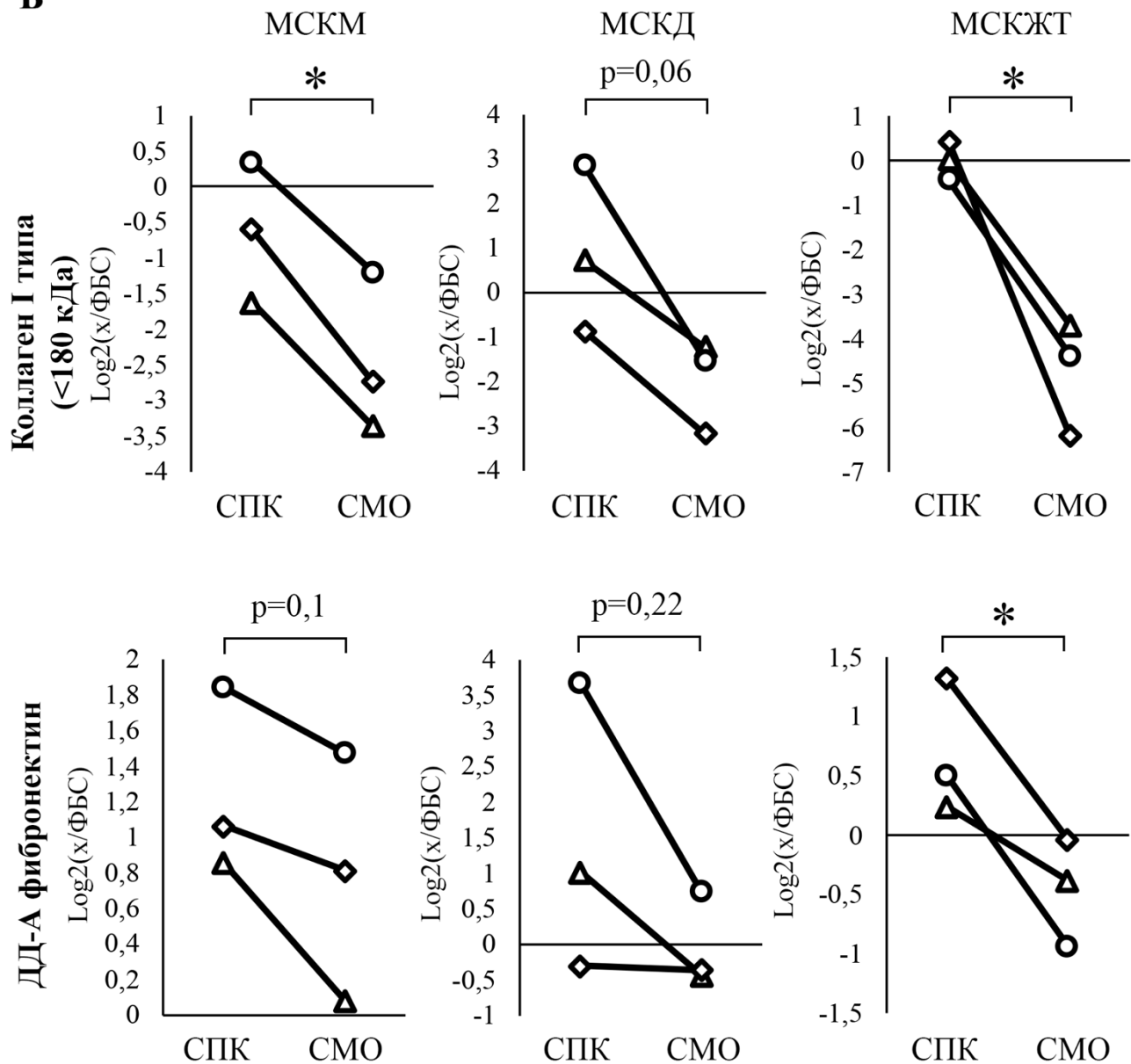


Рисунок 13. Влияние РФМ на содержание коллагена I типа и ДД-А фибронектина в культурах МСКМ, МСКД и МСКЖТ. А. Репрезентативные результаты иммуноблоттинга тотальных лизатов, полученных через 96 часов культивирования МСК с 10% СПК, СМО или ФБС. Б. Денситометрический анализ результатов иммуноблоттинга. 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; $n=3$, $*p<0,05$.

Депонирование коллагена I типа и ДД-А фибронектина во внеклеточном пространстве оценивали методом иммунофлуоресцентного мечения без пермеабиллизации 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. 14, А). 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. Ещё одной особенностью, связанной с коллагеном I типа, была бóльшая интенсивность его иммунофлуоресцентного сигнала в культурах МСКМ. Это совпадало с присутствием на иммуноблоттинге полосы высокомолекулярного коллагена I типа (>300 кДа), соответствующей, по-видимому, его внеклеточным агрегатам (рис. 13, А). 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.

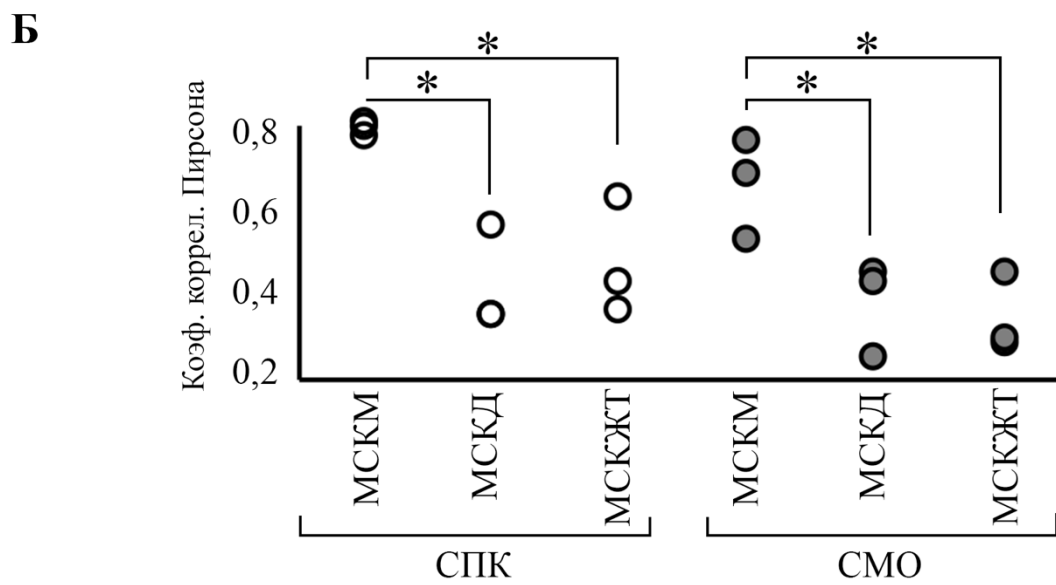
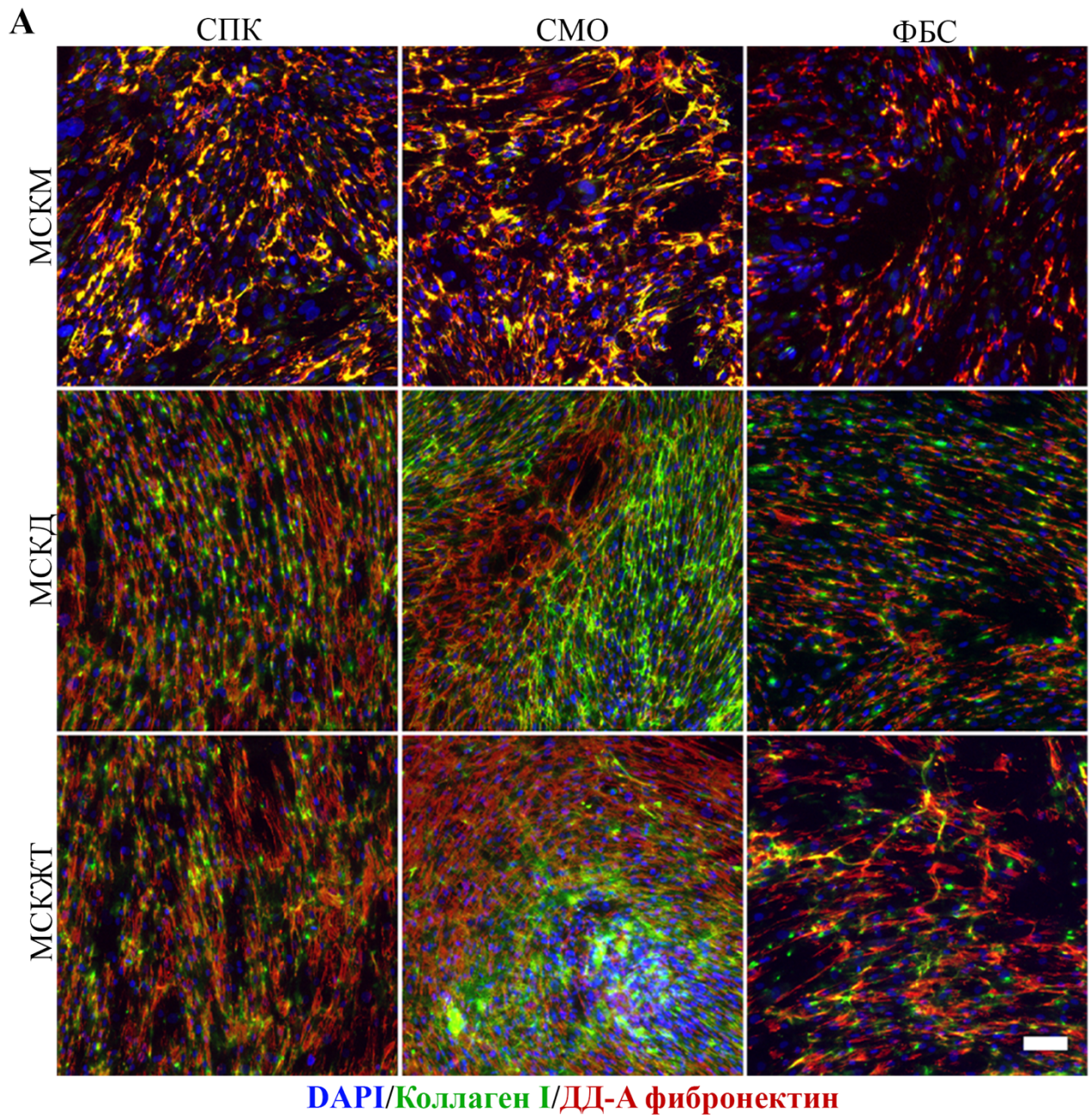


Рисунок 14. Депонирование коллагена I типа и ДД-А фибронектина в культурах МСК под действием СМО, СПК и ФБС. **А.** Иммунофлуоресцентное мечение локализованных вне клеток коллагена I типа и ДД-А фибронектина в МСКМ, МСКД и МСКЖТ через 96 часов культивирования с 10% СПК, СМО или ФБС. Масштабный отрезок 100 мкм. Ядра помечены DAPI. **Б.** 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; $n=3$, $*p<0,05$.

Колокализация коллагена I типа и ДД-А фибронектина под действием РФМ оставалась значимо выше в культурах МСКМ, чем в культурах МСКД и МСКЖТ (табл. 9; рис 14, Б), что хорошо согласовывалось с полученными ранее результатами при оценке способности исследуемых клеток к фенотипическому переходу в миофибробласты (рис 6, Б).

Таблица 9. Степень колокализации коллагена I типа и ДД-А фибронектина в исследуемых культурах МСК.

	МСКМ	МСКД	МСКЖТ
	Среднее \pm стандартное квадратичное отклонение, коэффициент корреляции Пирсона		
96 часов с СМО	0,667 \pm 0,117	0,387 \pm 0,110	0,350 \pm 0,095
96 часов с СПК	0,786 \pm 0,015	0,420 \pm 0,121	0,470 \pm 0,136

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. 14, А). 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. 15, 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. 15, Б, В).

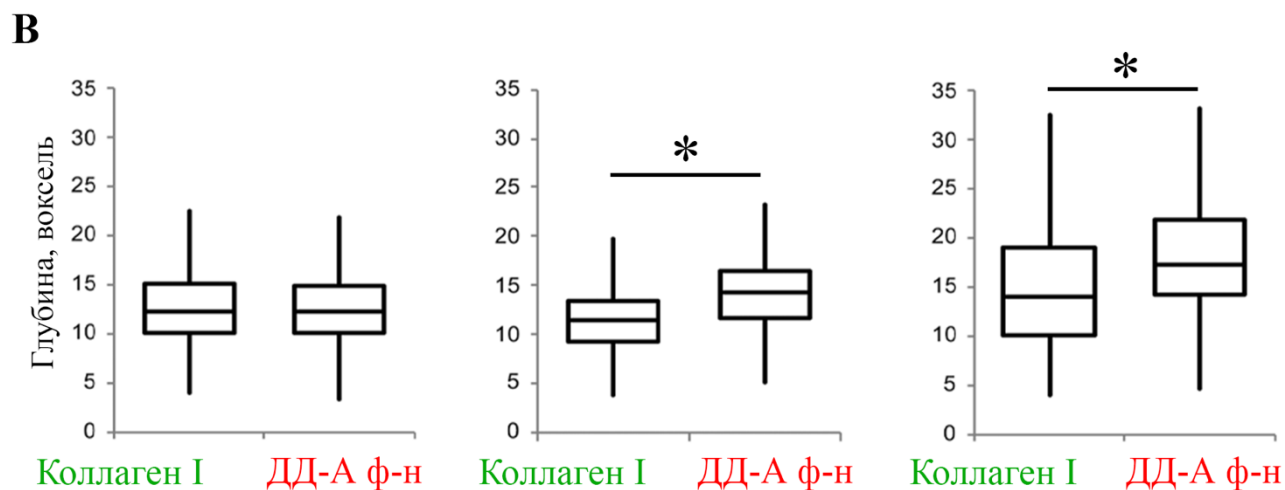
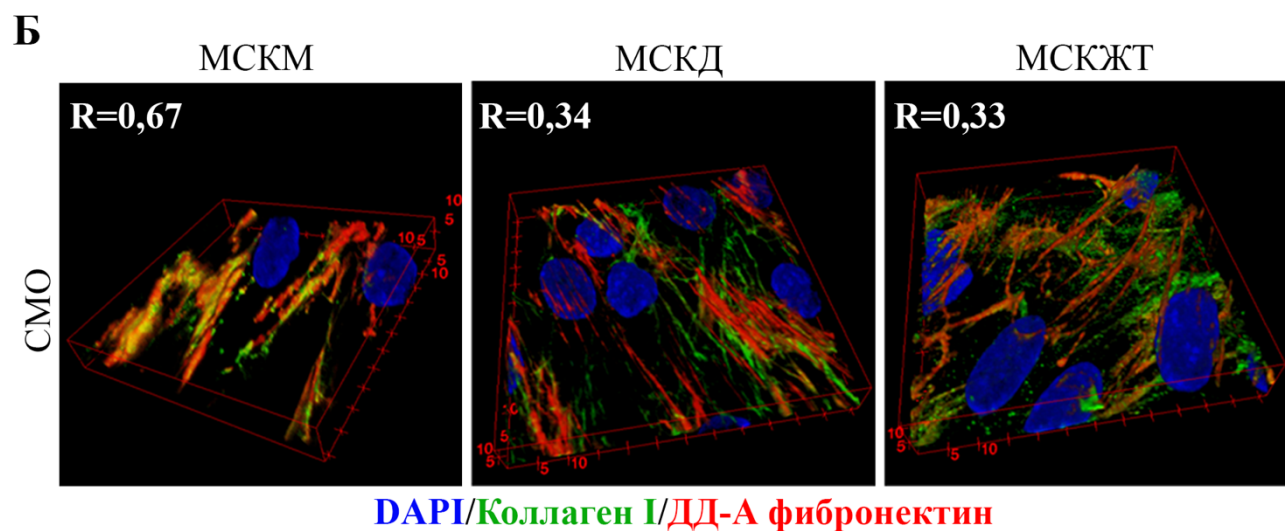
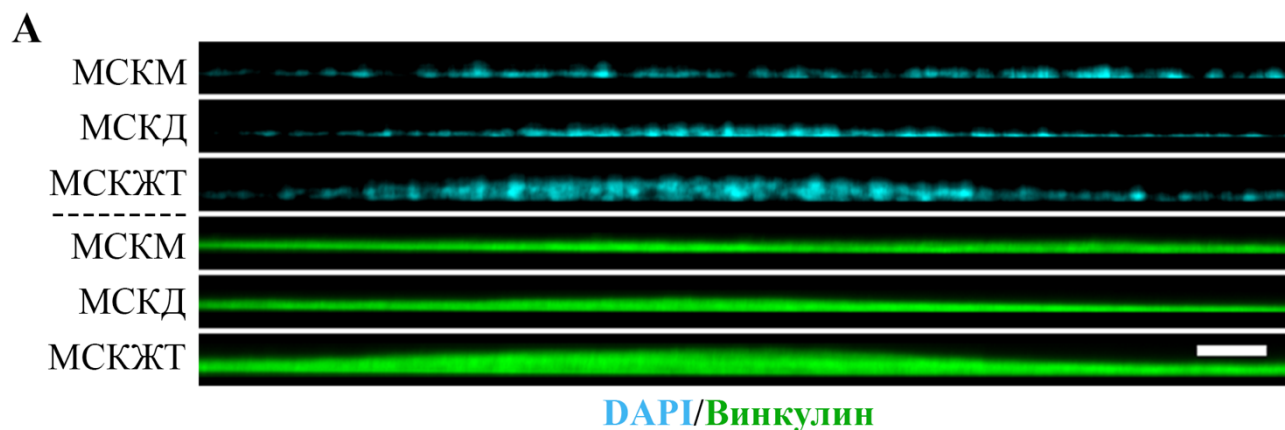


Рисунок 15. Влияние СМО на организацию клеток и белков ВКМ в культурах МСКМ, МСКД и МСКЖТ. **А.** «Холмы» в культурах МСКД и МСКЖТ, но не МСКМ. Конфокальная микроскопия, боковая проекция, масштабный отрезок 50 мкм. **Б.** Колокализация коллагена I типа и ДД-А фибронектина по данным конфокальной микроскопии. 3D-реконструкция. R – коэффициент корреляции Пирсона. **В.** Уровни локализации внеклеточных коллагена I типа и ДД-А фибронектина по высоте.

Таким образом, РФМ индуцировали фиброплазию в способных к ней культурах МСКД и МСКЖТ, но не в культурах МСКМ, у которых данная способность не только отсутствовала в стандартных условиях культивирования, но и не появлялась под действием РФМ. При этом МСКМ сохраняли тканеспецифичные особенности организации ВКМ.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценив *in vitro* фенотип и дифференцировочный потенциал МСКМ, МСКД и МСКЖТ, мы показали их соответствие критериям ISCT, что свидетельствовало о принадлежности данных клеток к одному типу. Под одним типом в данном случае подразумевается принадлежность к некоторому подмножеству множества фибробластоподобных клеток организма, составляющих основу стромы различных органов. Возможность выделения МСК в культуру и соответствие ряду признаков *in vitro* определяет принадлежность к указанному подмножеству, однако не даёт чёткого представления о его месте и доле в множестве. Основой такой неопределенности является отсутствие однозначных представлений о причинах, по которым МСК вообще могут выделяться в культуру, пролиферировать и дифференцироваться вне организма. Большинство исследователей считают, что это происходит из-за того, что МСК *in vivo* являются предшественниками более зрелых форм различных фибробластоподобных клеток, образующихся в ходе обновления тканей организма. Существуют и альтернативные точки зрения, сторонники одной из которых рассматривают МСК *in vitro* как частично дедифференцировавшиеся и снова вошедшие в клеточный цикл клетки, находящиеся в условиях, близких к тем, что они испытывают при повреждении тканей. Критерии ISCT, несмотря на имеющиеся пробелы в знаниях об их конкретном значении, позволяют в достаточно высокой степени унифицировать объект исследования, именуемый МСК, являясь адекватным ориентиром в области посвященных ему исследований.

Соответствие культур МСКМ, МСКД и МСКЖТ минимальным критериям ISCT по отдельности было показано в ряде работ, причем для МСКЖТ их количество гораздо выше, поскольку жировая ткань одной из первых рассматривалась как основной альтернативный костному мозгу источник мезенхимных стволовых клеток [123]. Соответствие критериям ISCT для МСКМ также было первоначально установлено в рамках поиска альтернативных источников мезенхимных стволовых клеток, в то время как для МСКД это было сделано в период сформировавшихся представлений об МСК как о мезенхимальных стромальных клетках [79, 98]. Важно отметить, что методы

выделения МСКД и в нашей работе, и в работах других авторов были идентичны тем, которые применяются для выделения фибробластов кожи, поэтому эти два названия в действительности относятся к одному и тому же объекту *in vitro*.

Подтверждая соответствие исследуемых МСК критериям ISCT, мы обратили внимание на такие особенности МСКМ, как меньший размер образующихся жировых капель при адипогенной дифференцировке, минеральных отложений при остеогенной дифференцировке и сфероидов, формируемых при хондрогенной дифференцировке. Аналогичные наблюдения в отношении адипо- и остеогенной дифференцировок были сделаны другими авторами при сравнении МСКМ с МСК, выделенными из костного мозга, пупочного канатика, пульпы зуба и жировой ткани [124, 125]. Данные отличия указывают на существование устойчивых тканеспецифичных свойств МСКМ, отличающих их от большинства других МСК. По-видимому, это объясняется особенностями эмбрионального развития матки.

В результате поиска тканеспецифичных особенностей МСКМ, имеющих отношение к безрубцовому заживлению эндометрия, нами было установлено, что данные клетки неспособны к фиброплазии как в стандартных условиях культивирования, так и под действием РФМ. Следовательно, тканеспецифичные свойства не позволяют МСКМ самостоятельно формировать устойчивые объемные тканеподобные структуры подобно тому, как это происходит в культурах МСКД и МСКЖТ. Конкретные причины данного феномена пока неизвестны и требуют дальнейшего изучения, однако можно предположить, что они имеют отношение к особенностям механорецепции, а также связаны с белками цитоскелета, межклеточными контактами и ВКМ. Эту точку зрения отчасти подтверждал тот факт, что во всех наших экспериментах, где производилась оценка депонирования ВКМ, мы обнаруживали в культурах МСКМ повышенную колокализацию коллагена I типа и ДД-А фибронектина, которая сохранялась вне зависимости от тех или иных стимулов.

Обнаруженные нами особенности МСКМ объясняют отсутствие формирования значительного объема вновь генерируемой путем фиброплазии соединительной ткани при восстановлении эндометрия в ходе менструации.

Поскольку именно из такой ткани в конечном итоге формируется рубцовая ткань, неспособность к фиброплазии может объяснять и отсутствие рубцевания. Вместе с тем, неспособность к фиброплазии сама по себе не объясняет отсутствия фиброобразования, поскольку для развития данного процесса достаточно трансформации в миофибробласты не вновь образуемых клеток стромы, а изначально находящихся в тканях [4].

Оценив способность к фенотипическому переходу в миофибробласты, мы обнаружили, что МСКМ совершают его *in vitro* под действием ТФР- β 1. При этом мы использовали МСКД, как положительный контроль, т.к. фибробласты кожи являются классическим объектом в данной области, МСКЖТ – как дополнительный и менее охарактеризованный в этом отношении референс [20, 96, 126], а концентрацию ТФР- β 1 (10 нг/мл) подобрали на основе данных литературы. Поскольку фенотипический переход МСКМ в миофибробласты ранее продемонстрирован не был, мы ориентировались на работы, в которых использовали МСК, выделенные непосредственно из эндометрия [127-130].

В наших экспериментах степень трансформации МСКМ в миофибробласты по совокупности оцениваемых параметров была не менее выраженной, чем у МСКД, и более выраженной, чем у МСКЖТ. Непосредственное действие ТФР- β 1 было более явным в культурах МСКД. Это объяснялось тем, что в контрольных образцах МСКД значительно реже происходил спонтанный фенотипический переход в миофибробласты и его прирост под действием мощного индуктора хорошо фиксировался использованными методами. На основе полученных данных мы пришли к выводу, что МСКМ не обладают обусловленной автономными тканеспецифичными свойствами устойчивостью к фенотипическому переходу в миофибробласты, которая могла бы объяснить отсутствие фиброобразования при восстановлении эндометрия.

Известно, что повышение экспрессии маркеров миофибробластов в эндометрии обнаруживается при некоторых заболеваниях. В работе Jianhong Wu и соавт. методом иммуноблоттинга показано, что в биоптатах эндометрия больных синдромом Ашермана (заболевание, характеризующееся развитием фиброза

эндометрия и образованием спаек в полости матки) значимо увеличивается содержание фосфорилированных SMAD2/3, коллагена I типа и α -ГМА [131]. Вместе с тем, важно отметить, что различия содержания α -ГМА между группами больных и здоровых были минимальны, а результаты иммуногистохимического мечения не обнаружили стресс-фибрилл, характерных для миофибробластов.

Более выраженные отличия содержания α -ГМА были получены J. Li и соавт. на крысиной модели синдрома Ашермана [132]. В данной работе появление положительных по α -ГМА клеток было более явным при иммунофлуоресцентном мечении, однако стресс-фибриллы вновь не были обнаружены. Показательно, что для индукции повреждения эндометрия, вызывающего его последующее фиброзирование, авторы выполняли кюретаж, после чего на 48 часов оставляли в полости матки нить, пропитанную липополисахаридом, поскольку одного из этих воздействий было недостаточно. В аналогичных экспериментах на кроликах необходимая степень воздействия для успешного моделирования синдрома Ашермана была сопоставимой с описанной выше [133]. Следовательно, несмотря на способность к фенотипическому переходу в миофибробласты, клетки стромы эндометрия *in vivo* осуществляют его крайне неохотно. Ещё одним подтверждением данной точки зрения является распределение миофибробластов в тканях при экстрагенитальном эндометриозе, при котором эктопические очаги эндометрия располагаются на брюшине, погружаясь в окружающие ткани. Реакцией последних на такую инвазию является фиброзирование и накопление миофибробластов, однако непосредственно в строме эктопического эндометрия не происходит ни фиброза, ни образования миофибробластов [134].

Учитывая, что, согласно нашим результатам, МСКМ *in vitro* способны совершать фенотипический переход в миофибробласты сопоставимо с МСКД и МСКЖТ, а в менструальном отделяемом содержится высокая концентрация ТФР- β 1, логично предположить, что в эндометрии имеет место кондиционное (обусловленное регуляторным действием микроокружения) подавление данного перехода, сохраняющееся даже при повреждении эндометрия.

Проведенная нами оценка действия РФМ на МСКМ в отношении фенотипического перехода в миофибробласты подкрепляет данную точку зрения, указывая на растворимую природу факторов, подавляющих приобретение МСК характерного для миофибробластов сократительного фенотипа, а также снижающих уровень продукции коллагена I типа и в меньшей степени ДД-А фибронектина. Таким образом, в ходе менструации в эндометрии образуются растворимые факторы, противодействующие его фиброзированию. Вероятно, фиброз эндометрия может развиваться не только под действием мощных профиброгенных стимулов, но и из-за недостаточной продукции противодействующих ему факторов. Этот тезис отчасти подтверждается существованием описанных случаев идиопатического синдрома Ашермана у пациенток (в том числе одной девственницы) без инфекционных заболеваний эндометрия или хирургических вмешательств на матке в анамнезе [135].

Важно отметить, что подавление РФМ фенотипического перехода МСК в миофибробласты обнаруживалось во всех исследуемых культурах, то есть этот эффект не являлся тканеспецифичным. В контексте сравнительного подхода данный факт наводит на мысль о гипотетической возможности использования РФМ для подавления фиброзирования органов и тканей помимо эндометрия.

В 2019 году Evans и др. опубликовали работу, в которой оценивали действие РФМ на заживление кожной раны в модели на свиньях [136]. На каждом боку двух взятых в эксперимент животных дерматомом формировали по 5 ран глубиной 1 мм. По завершении процедуры общее число ран оказалось равным 20. Случайным образом их разделили на 2 группы. На раны первой группы наносили СМО, а второй – СПК человека. После нанесения сывороток раны укрывали повязкой с марлевой впитывающей основой. По завершении экспериментов авторы установили, что под действием РФМ происходило ускорение эпителизации на ранних этапах ранозаживления – различия были наиболее выраженными на 5 сутки эксперимента.

Поскольку в работе был сделан упор именно на оценку скорости эпителизации, другой информации о ходе заживления, в том числе о возможном

фиброзировании подлежащей дермы, было представлено значительно меньше. Эпителизация всех ран завершалась к 7 суткам, а на 19 сутки животных выводили из эксперимента, после чего проводили гистологическое исследование, по результатам которого не обнаружили значимых отличий между ранами из первой и второй групп.

На наш взгляд, вопрос о возможности использования РФМ для подавления фиброирования восстанавливающихся тканей требует дополнительного изучения. Для этого существует достаточное количество соответствующих предпосылок, в том числе среди обнаруженных нами фактов, однако исследований, направленных на полномасштабное изучение именно этого вопроса, не проводилось.

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 обладают тканеспецифичной устойчивостью к фиброплазии *in vitro*.
3. Мезенхимальные стромальные клетки менструального отделяемого, в сравнении с мезенхимальными стромальными клетками дермы и жировой ткани, обладают устойчивой тканеспецифичной особенностью взаимного расположения находящихся во внеклеточном пространстве коллагена I типа и ДД-А фибронектина, заключающейся в большей степени колокализации данных матриксных белков *in vitro*.
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 СОКРАЩЕНИЙ

- БСА** – бычий сывороточный альбумин
ВКМ – внеклеточный матрикс
ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
ГТФ - гуанозинтрифосфат
ДД-А – дополнительный домен А
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИЛ-1 β – интерлейкин-1 β
ИЛ-6 – интерлейкин-6
ИЛ-8 – интерлейкин-8
ИЛ-18 – интерлейкин-18
ИФА – иммуноферментный анализ
ММП – матриксные металлопротеиназы
МСК – мезенхимальные стромальные клетки
МСКД – мезенхимальные стромальные клетки дермы
МСКЖТ – мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани
МСКМ – мезенхимальные стромальные клетки менструального отделяемого
ПВДФ – поливинилиденфторид
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РФМ – растворимые факторы, образуемые в эндометрии в ходе менструации
СМО – сыворотка менструального отделяемого
СПК – сыворотка периферической крови
ТФР- β 1 – трансформирующий фактор роста β 1
ФБС – фетальная бычья сыворотка
ФНО- α – фактор некроза опухоли α
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ЦОГ-2 – циклооксигеназа-2
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ASC – apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
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
EGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок
HLA-DR – человеческий лейкоцитарный антиген – DR изотип
IGFBP1 – белок 1, связывающий инсулиноподобный фактор роста
ISCT – международное общество клеточной терапии
MAPK - митоген-активируемые протеинкиназы
NF- κ B – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLRP3 – nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin
NP-1 – нейропилин 1
pSMAD2 – фосфорилированный SMAD2
RhoA - ras homolog family member a
SMAD2 – suppressor of mothers against decapentaplegic 2

SMAD3 – suppressor of mothers against decapentaplegic 3
SMAD4 – suppressor of mothers against decapentaplegic 4
TβRI – рецептор I типа трансформирующего фактора роста β
TβRII – рецептор II типа трансформирующего фактора роста β
α-ГМА – α-гладкомышечный актин
domain containing 3
VEGF – фактор роста эндотелия сосудов
VEGFR1 – рецептор 1 фактора роста эндотелия сосудов
VEGFR2 – рецептор 2 фактора роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kisseleva T., Brenner D. A. Fibrogenesis of Parenchymal Organs // *Proceedings of the American Thoracic Society*. – 2008. – Т. 5, № 3. – С. 338-342.
2. Rosenbloom J., Macarak E., Piera-Velazquez S., Jimenez S. A. Human Fibrotic Diseases: Current Challenges in Fibrosis Research // *Methods Mol Biol*. – 2017. – Т. 1627. – С. 1-23.
3. Wynn T. A., Ramalingam T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease // *Nat Med*. – 2012. – Т. 18, № 7. – С. 1028-40.
4. Rockey D. C., Bell P. D., Hill J. A. Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure // *N Engl J Med*. – 2015. – Т. 372, № 12. – С. 1138-49.
5. A history of regeneration research: milestones in the evolution of a science. / Dinsmore C. E.: Cambridge University Press, 1991.
6. Maden M. The evolution of regeneration - where does that leave mammals? // *Int J Dev Biol*. – 2018. – Т. 62, № 6-7-8. – С. 369-372.
7. Bely A. E., Nyberg K. G. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field // *Trends Ecol Evol*. – 2010. – Т. 25, № 3. – С. 161-70.
8. Alibardi L. Review: Biological and Molecular Differences between Tail Regeneration and Limb Scarring in Lizard: An Inspiring Model Addressing Limb Regeneration in Amniotes // *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. – 2017. – Т. 328, № 6. – С. 493-514.
9. Ranadive I., Patel S., Buch P., Uggini G., Desai I., Balakrishnan S. Inherent variations in the cellular events at the site of amputation orchestrate scar-free wound healing in the tail and scarred wound healing in the limb of lizard *Hemidactylus flaviviridis* // *Wound Repair Regen*. – 2018. – Т. 26, № 5. – С. 366-380.
10. Maybin J. A., Critchley H. O. Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond // *Hum Reprod Update*. – 2015. – Т. 21, № 6. – С. 748-61.
11. Johannisson E., Fournier K., Riotton G. Regeneration of the human endometrium and presence of inflammatory cells following diagnostic curettage // *Acta Obstet Gynecol Scand*. – 1981. – Т. 60, № 5. – С. 451-7.
12. Deutsch A., Sasaki K. J., Cholkeri-Singh A. Resectoscopic Surgery for Polyps and Myomas: A Review of the Literature // *J Minim Invasive Gynecol*. – 2017. – Т. 24, № 7. – С. 1104-1110.
13. Ben-Nagi J., Walker A., Jurkovic D., Yazbek J., Aplin J. D. Effect of cesarean delivery on the endometrium // *Int J Gynaecol Obstet*. – 2009. – Т. 106, № 1. – С. 30-4.
14. NOVAK E., LINDE R. W. T. THE ENDOMETRIUM OF THE MENSTRUATING UTERUS // *Journal of the American Medical Association*. – 1924. – Т. 83, № 12. – С. 900-906.
15. Markee J. Menstruation in intraocular transplants in the rhesus monkey // *Contrib Embryol*. – 1940. – Т. 28. – С. 219-308.
16. Garry R., Hart R., Karthigasu K. A., Burke C. A re-appraisal of the morphological changes within the endometrium during menstruation: a hysteroscopic, histological and scanning electron microscopic study // *Hum Reprod*. – 2009. – Т. 24, № 6. – С. 1393-401.
17. Ludwig H., Metzger H. The re-epithelization of endometrium after menstrual desquamation // *Arch Gynakol*. – 1976. – Т. 221, № 1. – С. 51-60.

18. Ferenczy A. Studies on the cytodynamics of human endometrial regeneration. I. Scanning electron microscopy // *Am J Obstet Gynecol.* – 1976. – T. 124, № 1. – C. 64-74.
19. Salamonsen L. A. Tissue injury and repair in the female human reproductive tract // *Reproduction.* – 2003. – T. 125, № 3. – C. 301-11.
20. Hinz B. The role of myofibroblasts in wound healing // *Curr Res Transl Med.* – 2016. – T. 64, № 4. – C. 171-177.
21. Plikus M. V., Wang X., Sinha S., Forte E., Thompson S. M., Herzog E. L., Driskell R. R., Rosenthal N., Biernaskie J., Horsley V. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease // *Cell.* – 2021. – T. 184, № 15. – C. 3852-3872.
22. Rodrigues M., Kosaric N., Bonham C. A., Gurtner G. C. Wound Healing: A Cellular Perspective // *Physiological Reviews.* – 2019. – T. 99, № 1. – C. 665-706.
23. Farkhad N. K., Mahmoudi A., Mahdipour E. How Similar are Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Different Origins? A Review of Comparative Studies // *Current Stem Cell Research & Therapy.* – 2021. – T. 16, № 8. – C. 980-993.
24. Lee S. K., Kim C. J., Kim D. J., Kang J. H. Immune Cells in the Female Reproductive Tract // *Immune Network.* – 2015. – T. 15, № 1. – C. 16-26.
25. L Mescher A. Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, FIFTEENTH // Book Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, FIFTEENTH / Editor McGraw-Hill Education, 2018.
26. Rogers P. A. Structure and function of endometrial blood vessels // *Hum Reprod Update.* – 1996. – T. 2, № 1. – C. 57-62.
27. Newman T. A., Bailey J. L., Stocker L. J., Woo Y. L., Macklon N. S., Cheong Y. C. Expression of neuronal markers in the endometrium of women with and those without endometriosis // *Human Reproduction.* – 2013. – T. 28, № 9. – C. 2502-2510.
28. Brauer M. M., Smith P. G. Estrogen and female reproductive tract innervation: Cellular and molecular mechanisms of autonomic neuroplasticity // *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical.* – 2015. – T. 187. – C. 1-17.
29. Noyes R. W., Hertig A. T., Rock J. Dating the Endometrial Biopsy // *Fertility and Sterility.* – 1950. – T. 1, № 1. – C. 3-25.
30. Critchley H. O. D., Babayev E., Bulun S. E., Clark S., Garcia-Grau I., Gregersen P. K., Kilcoyne A., Kim J. Y. J., Lavender M., Marsh E. E., Matteson K. A., Maybin J. A., Metz C. N., Moreno I., Silk K., Sommer M., Simon C., Tariyal R., Taylor H. S., Wagner G. P., Griffith L. G. Menstruation: science and society // *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* – 2020. – T. 223, № 5. – C. 624-664.
31. Gellersen B., Brosens J. J. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure // *Endocr Rev.* – 2014. – T. 35, № 6. – C. 851-905.
32. Slayden O. D., Brenner R. M. A critical period of progesterone withdrawal precedes menstruation in macaques // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2006. – T. 4 Suppl 1, № Suppl 1. – C. S6.
33. Hapangama D. K., Critchley H. O., Henderson T. A., Baird D. T. Mifepristone-induced vaginal bleeding is associated with increased immunostaining for cyclooxygenase-2 and decrease in prostaglandin dehydrogenase in luteal phase endometrium // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2002. – T. 87, № 11. – C. 5229-34.
34. Coppens M. T., Dhont M. A., De Boever J. G., Serreyn R. F., Vandekerckhove D. A., Roels H. J. The distribution of oestrogen and progesterone receptors in the human endometrial basal and functional layer during the normal menstrual cycle. An immunocytochemical study // *Histochemistry.* – 1993. – T. 99, № 2. – C. 121-6.
35. Schatz F., Guzeloglu-Kayisli O., Arlier S., Kayisli U. A., Lockwood C. J. The role of decidual cells in uterine hemostasis, menstruation, inflammation, adverse pregnancy outcomes and abnormal uterine bleeding // *Hum Reprod Update.* – 2016. – T. 22, № 4. – C. 497-515.
36. Coomarasamy A., Devall A. J., Brosens J. J., Quenby S., Stephenson M. D., Sierra S., Christiansen O. B., Small R., Brewin J., Roberts T. E., Dhillon-Smith R., Harb H., Noordali H., Papadopoulou A., Eapen A., Prior M., Di Renzo G. C., Hinshaw K., Mol B. W., Lumsden M. A., Khalaf Y., Shennan A., Goddijn M., van Wely M., Al-Memar M., Bennett P., Bourne T., Rai R., Regan L., Gallos I. D.

- Micronized vaginal progesterone to prevent miscarriage: a critical evaluation of randomized evidence // *Am J Obstet Gynecol.* – 2020. – T. 223, № 2. – C. 167-176.
37. van der Burg B., van der Saag P. T. Nuclear factor-kappa-B/steroid hormone receptor interactions as a functional basis of anti-inflammatory action of steroids in reproductive organs // *Mol Hum Reprod.* – 1996. – T. 2, № 6. – C. 433-8.
38. Kalkhoven E., Wissink S., van der Saag P. T., van der Burg B. Negative interaction between the RelA(p65) subunit of NF-kappaB and the progesterone receptor // *J Biol Chem.* – 1996. – T. 271, № 11. – C. 6217-24.
39. *Janeway's immunobiology.* / Murphy K., Weaver C.: Garland science, 2016.
40. Evans J., Salamonsen L. A. Decidualized human endometrial stromal cells are sensors of hormone withdrawal in the menstrual inflammatory cascade // *Biol Reprod.* – 2014. – T. 90, № 1. – C. 14.
41. Xu X., Chen X., Li Y., Cao H., Shi C., Guan S., Zhang S., He B., Wang J. Cyclooxygenase-2 regulated by the nuclear factor- κ B pathway plays an important role in endometrial breakdown in a female mouse menstrual-like model // *Endocrinology.* – 2013. – T. 154, № 8. – C. 2900-11.
42. Armstrong G. M., Maybin J. A., Murray A. A., Nicol M., Walker C., Saunders P. T. K., Rossi A. G., Critchley H. O. D. Endometrial apoptosis and neutrophil infiltration during menstruation exhibits spatial and temporal dynamics that are recapitulated in a mouse model // *Scientific Reports.* – 2017. – T. 7. – C. 14.
43. Azlan A., Salamonsen L. A., Hutchison J., Evans J. Endometrial inflammasome activation accompanies menstruation and may have implications for systemic inflammatory events of the menstrual cycle // *Hum Reprod.* – 2020. – T. 35, № 6. – C. 1363-1376.
44. ROBBINS & COTRAN PATHOLOGIC BASIS OF DISEASE. / KUMAR V. A.: ELSEVIER-HEALTH SCIENCE, 2020.
45. Markee J. E. Morphological Basis for Menstrual Bleeding // *Bull N Y Acad Med.* – 1948. – T. 24, № 4. – C. 253-68.
46. Baird D. T., Cameron S. T., Critchley H. O., Drudy T. A., Howe A., Jones R. L., Lea R. G., Kelly R. W. Prostaglandins and menstruation // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 1996. – T. 70, № 1. – C. 15-7.
47. Cousins F. L., Kirkwood P. M., Saunders P. T., Gibson D. A. Evidence for a dynamic role for mononuclear phagocytes during endometrial repair and remodelling // *Sci Rep.* – 2016. – T. 6. – C. 36748.
48. Marbaix E., Kokorine I., Moulin P., Donnez J., Eeckhout Y., Courtoy P. J. Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked in vitro and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1996. – T. 93, № 17. – C. 9120-5.
49. Zhang J., Salamonsen L. A. In vivo evidence for active matrix metalloproteinases in human endometrium supports their role in tissue breakdown at menstruation // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2002. – T. 87, № 5. – C. 2346-51.
50. Evans J., Salamonsen L. A. Inflammation, leukocytes and menstruation // *Rev Endocr Metab Disord.* – 2012. – T. 13, № 4. – C. 277-88.
51. Kaitu'u-Lino T. J., Morison N. B., Salamonsen L. A. Neutrophil depletion retards endometrial repair in a mouse model // *Cell Tissue Res.* – 2007. – T. 328, № 1. – C. 197-206.
52. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation // *Nature Reviews Immunology.* – 2013. – T. 13, № 3. – C. 159-175.
53. Govorov I., Ekelund L., Chaireti R., Elfvinge P., Holmstrom M., Bremme K., Mints M. Heavy menstrual bleeding and health-associated quality of life in women with von Willebrand's disease // *Experimental and Therapeutic Medicine.* – 2016. – T. 11, № 5. – C. 1923-1929.
54. Davies J., Kadir R. A. Endometrial haemostasis and menstruation // *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders.* – 2012. – T. 13, № 4. – C. 289-299.
55. Kaitu'u-Lino T. J., Morison N. B., Salamonsen L. A. Estrogen is not essential for full endometrial restoration after breakdown: lessons from a mouse model // *Endocrinology.* – 2007. – T. 148, № 10. – C. 5105-11.

56. Cousins F. L., Murray A., Esnal A., Gibson D. A., Critchley H. O. D., Saunders P. T. K. Evidence from a Mouse Model That Epithelial Cell Migration and Mesenchymal-Epithelial Transition Contribute to Rapid Restoration of Uterine Tissue Integrity during Menstruation // *Plos One*. – 2014. – T. 9, № 1.
57. Kaitu'u-Lino T. J., Ye L., Gargett C. E. Reepithelialization of the Uterine Surface Arises from Endometrial Glands: Evidence from a Functional Mouse Model of Breakdown and Repair // *Endocrinology*. – 2010. – T. 151, № 7. – C. 3386-3395.
58. Patterson A. L., Zhang L., Arango N. A., Teixeira J., Pru J. K. Mesenchymal-to-epithelial transition contributes to endometrial regeneration following natural and artificial decidualization // *Stem Cells Dev*. – 2013. – T. 22, № 6. – C. 964-74.
59. Cousins F. L., Murray A., Esnal A., Gibson D. A., Critchley H. O., Saunders P. T. Evidence from a mouse model that epithelial cell migration and mesenchymal-epithelial transition contribute to rapid restoration of uterine tissue integrity during menstruation // *PLoS One*. – 2014. – T. 9, № 1. – C. e86378.
60. Owusu-Akyaw A., Krishnamoorthy K., Goldsmith L. T., Morelli S. S. The role of mesenchymal-epithelial transition in endometrial function // *Hum Reprod Update*. – 2019. – T. 25, № 1. – C. 114-133.
61. Ghosh A., Syed S. M., Kumar M., Carpenter T. J., Teixeira J. M., Houairia N., Negi S., Tanwar P. S. In Vivo Cell Fate Tracing Provides No Evidence for Mesenchymal to Epithelial Transition in Adult Fallopian Tube and Uterus // *Cell Rep*. – 2020. – T. 31, № 6. – C. 107631.
62. Fan X., Krieg S., Kuo C. J., Wiegand S. J., Rabinovitch M., Druzin M. L., Brenner R. M., Giudice L. C., Nayak N. R. VEGF blockade inhibits angiogenesis and reepithelialization of endometrium // *Faseb j*. – 2008. – T. 22, № 10. – C. 3571-80.
63. Atala A., Irvine D. J., Moses M., Shaunak S. Wound Healing Versus Regeneration: Role of the Tissue Environment in Regenerative Medicine // *MRS Bull*. – 2010. – T. 35, № 8.
64. Arenas Gómez C. M., Sabin K. Z., Echeverri K. Wound healing across the animal kingdom: Crosstalk between the immune system and the extracellular matrix // *Dev Dyn*. – 2020. – T. 249, № 7. – C. 834-846.
65. Landen N. X., Li D. Q., Stahle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2016. – T. 73, № 20. – C. 3861-3885.
66. Evans J., Kaitu'u-Lino T., Salamonsen L. A. Extracellular matrix dynamics in scar-free endometrial repair: perspectives from mouse in vivo and human in vitro studies // *Biol Reprod*. – 2011. – T. 85, № 3. – C. 511-23.
67. Gaide Chevronnay H. P., Galant C., Lemoine P., Courtoy P. J., Marbaix E., Henriët P. Spatiotemporal coupling of focal extracellular matrix degradation and reconstruction in the menstrual human endometrium // *Endocrinology*. – 2009. – T. 150, № 11. – C. 5094-105.
68. Gaide Chevronnay H. P., Cornet P. B., Delvaux D., Lemoine P., Courtoy P. J., Henriët P., Marbaix E. Opposite regulation of transforming growth factors-beta2 and -beta3 expression in the human endometrium // *Endocrinology*. – 2008. – T. 149, № 3. – C. 1015-25.
69. Lodyga M., Hinz B. TGF- β 1 - A truly transforming growth factor in fibrosis and immunity // *Semin Cell Dev Biol*. – 2020. – T. 101. – C. 123-139.
70. Friedenstein A. J., Chailakhyan R. K., Latsinik N. V., Panasyuk A. F., Keiliss-Borok I. V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo // *Transplantation*. – 1974. – T. 17, № 4. – C. 331-40.
71. Friedenstein A. Stromal-hematopoietic interrelationships: Maximov's ideas and modern models // *Haematol Blood Transfus*. – 1989. – T. 32. – C. 159-67.
72. Owen M., Friedenstein A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors // *Ciba Found Symp*. – 1988. – T. 136. – C. 42-60.
73. Friedenstein A. J. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo // *Haematol Blood Transfus*. – 1980. – T. 25. – C. 19-29.
74. Caplan A. I. Mesenchymal stem cells // *J Orthop Res*. – 1991. – T. 9, № 5. – C. 641-50.
75. Caplan A. I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! // *Stem Cells Transl Med*. – 2017. – T. 6, № 6. – C. 1445-1451.
76. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The

- International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. – 2006. – T. 8, № 4. – C. 315-7.
77. Murray I. R., West C. C., Hardy W. R., James A. W., Park T. S., Nguyen A., Tawonsawatruk T., Lazzari L., Soo C., Péault B. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2014. – T. 71, № 8. – C. 1353-1374.
78. Hematti P. Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity? // *Cytotherapy*. – 2012. – T. 14, № 5. – C. 516-521.
79. Haniffa M. A., Collin M. P., Buckley C. D., Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? // *Haematologica*. – 2009. – T. 94, № 2. – C. 258-63.
80. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. / Freshney R. I.: John Wiley & Sons, 2015.
81. Crisan M., Yap S., Casteilla L., Chen C.-W., Corselli M., Park T. S., Andriolo G., Sun B., Zheng B., Zhang L., Norotte C., Teng P.-N., Traas J., Schugar R., Deasy B. M., Badylak S., Bühring H.-J., Giacobino J.-P., Lazzari L., Huard J., Péault B. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs // *Cell Stem Cell*. – 2008. – T. 3, № 3. – C. 301-313.
82. Veréb Z., Póliska S., Albert R., Olstad O. K., Boratkó A., Csontos C., Moe M. C., Facskó A., Petrovski G. Role of Human Corneal Stroma-Derived Mesenchymal-Like Stem Cells in Corneal Immunity and Wound Healing // *Scientific Reports*. – 2016. – T. 6, № 1. – C. 26227.
83. McAndrews K. M., Miyake T., Ehsanipour E. A., Kelly P. J., Becker L. M., McGrail D. J., Sugimoto H., LeBleu V. S., Ge Y., Kalluri R. Dermal α SMA⁺ myofibroblasts orchestrate skin wound repair via β 1 integrin and independent of type I collagen production // *The EMBO Journal*. – 2022. – T. 41, № 7. – C. e109470.
84. Foster D. S., Januszyk M., Yost K. E., Chinta M. S., Gulati G. S., Nguyen A. T., Burcham A. R., Salhotra A., Ransom R. C., Henn D., Chen K., Mascharak S., Tolentino K., Titan A. L., Jones R. E., da Silva O., Leavitt W. T., Marshall C. D., des Jardins-Park H. E., Hu M. S., Wan D. C., Wernig G., Wagh D., Collier J., Norton J. A., Gurtner G. C., Newman A. M., Chang H. Y., Longaker M. T. Integrated spatial multiomics reveals fibroblast fate during tissue repair // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2021. – T. 118, № 41.
85. Shook B. A., Wasko R. R., Rivera-Gonzalez G. C., Salazar-Gatzimas E., López-Giráldez F., Dash B. C., Muñoz-Rojas A. R., Aultman K. D., Zwick R. K., Lei V., Arbiser J. L., Miller-Jensen K., Clark D. A., Hsia H. C., Horsley V. Myofibroblast proliferation and heterogeneity are supported by macrophages during skin repair // *Science*. – 2018. – T. 362, № 6417.
86. Dulauroy S., Di Carlo S. E., Langa F., Eberl G., Peduto L. Lineage tracing and genetic ablation of ADAM12(+) perivascular cells identify a major source of profibrotic cells during acute tissue injury // *Nat Med*. – 2012. – T. 18, № 8. – C. 1262-70.
87. Clark R. A., McCoy G. A., Folkvord J. M., McPherson J. M. TGF-beta 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrix-dependent event // *J Cell Physiol*. – 1997. – T. 170, № 1. – C. 69-80.
88. Yang J., Yamato M., Nishida K., Ohki T., Kanzaki M., Sekine H., Shimizu T., Okano T. Cell delivery in regenerative medicine: the cell sheet engineering approach // *J Control Release*. – 2006. – T. 116, № 2. – C. 193-203.
89. Kim K., Bou-Ghannam S., Kameishi S., Oka M., Grainger D. W., Okano T. Allogeneic mesenchymal stem cell sheet therapy: A new frontier in drug delivery systems // *J Control Release*. – 2021. – T. 330. – C. 696-704.
90. O'Kane S., Ferguson M. W. Transforming growth factor beta s and wound healing // *Int J Biochem Cell Biol*. – 1997. – T. 29, № 1. – C. 63-78.
91. Heldin C. H., Moustakas A. Signaling Receptors for TGF- β Family Members // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2016. – T. 8, № 8.
92. Kim K. K., Sheppard D., Chapman H. A. TGF- β 1 Signaling and Tissue Fibrosis // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2018. – T. 10, № 4.

93. Denu R. A., Nemcek S., Bloom D. D., Goodrich A. D., Kim J., Mosher D. F., Hematti P. Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable // *Acta Haematol.* – 2016. – T. 136, № 2. – C. 85-97.
94. Serini G., Bochaton-Piallat M. L., Ropraz P., Geinoz A., Borsi L., Zardi L., Gabbiani G. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1 // *J Cell Biol.* – 1998. – T. 142, № 3. – C. 873-81.
95. Hinz B., McCulloch C. A., Coelho N. M. Mechanical regulation of myofibroblast phenoconversion and collagen contraction // *Exp Cell Res.* – 2019. – T. 379, № 1. – C. 119-128.
96. Kakudo N., Kushida S., Suzuki K., Ogura T., Notodihardjo P. V., Hara T., Kusumoto K. Effects of transforming growth factor-beta1 on cell motility, collagen gel contraction, myofibroblastic differentiation, and extracellular matrix expression of human adipose-derived stem cell // *Hum Cell.* – 2012. – T. 25, № 4. – C. 87-95.
97. Scharenberg M. A., Pippenger B. E., Sack R., Zingg D., Ferralli J., Schenk S., Martin I., Chiquet-Ehrismann R. TGF- β -induced differentiation into myofibroblasts involves specific regulation of two MKL1 isoforms // *J Cell Sci.* – 2014. – T. 127, № Pt 5. – C. 1079-91.
98. 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. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population // *J Transl Med.* – 2007. – T. 5. – C. 57.
99. Taylor H. S. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients // *Jama.* – 2004. – T. 292, № 1. – C. 81-5.
100. Rossignoli F., Caselli A., Grisendi G., Piccinno S., Burns J. S., Murgia A., Veronesi E., Loschi P., Masini C., Conte P., Paolucci P., Horwiz E. M., Dominici M. Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood // *Biomed Res Int.* – 2013. – T. 2013. – C. 901821.
101. Kazemnejad S., Akhondi M. M., Soleimani M., Zarnani A. H., Khanmohammadi M., Darzi S., Alimoghadam K. Characterization and chondrogenic differentiation of menstrual blood-derived stem cells on a nanofibrous scaffold // *Int J Artif Organs.* – 2012. – T. 35, № 1. – C. 55-66.
102. Ong Y. R., Cousins F. L., Yang X., Mushafi A., Breault D. T., Gargett C. E., Deane J. A. Bone Marrow Stem Cells Do Not Contribute to Endometrial Cell Lineages in Chimeric Mouse Models // *Stem Cells.* – 2018. – T. 36, № 1. – C. 91-102.
103. Darzi S., Zarnani A. H., Jeddi-Tehrani M., Entezami K., Mirzadegan E., Akhondi M. M., Talebi S., Khanmohammadi M., Kazemnejad S. Osteogenic differentiation of stem cells derived from menstrual blood versus bone marrow in the presence of human platelet releasate // *Tissue Eng Part A.* – 2012. – T. 18, № 15-16. – C. 1720-8.
104. Khanmohammadi M., Khanjani S., Bakhtyari M. S., Zarnani A. H., Edalatkah H., Akhondi M. M., Mirzadegan E., Kamali K., Alimoghadam K., Kazemnejad S. Proliferation and chondrogenic differentiation potential of menstrual blood- and bone marrow-derived stem cells in two-dimensional culture // *Int J Hematol.* – 2012. – T. 95, № 5. – C. 484-93.
105. Khanmohammadi M., Khanjani S., Edalatkah H., Zarnani A. H., Heidari-Vala H., Soleimani M., Alimoghaddam K., Kazemnejad S. Modified protocol for improvement of differentiation potential of menstrual blood-derived stem cells into adipogenic lineage // *Cell Prolif.* – 2014. – T. 47, № 6. – C. 615-23.
106. Domnina A. P., Novikova P. V., Fridlyanskaya, II, Shilina M. A., Zenin V. V., Nikolsky N. N. [INDUCTION OF DECIDUAL DIFFERENTIATION OF ENDOMETRIAL MESENCHYMAL STEM CELLS] // *Tsitologiya.* – 2015. – T. 57, № 12. – C. 880-4.
107. Chen J. Y., Mou X. Z., Du X. C., Xiang C. Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins // *Asian Pac J Trop Med.* – 2015. – T. 8, № 9. – C. 739-46.
108. Alcayaga-Miranda F., Cuenca J., Luz-Crawford P., Aguila-Díaz C., Fernandez A., Figueroa F. E., Khoury M. Characterization of menstrual stem cells: angiogenic effect, migration and hematopoietic stem cell support in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells // *Stem Cell Res Ther.* – 2015. – T. 6, № 1. – C. 32.

109. Aleahmad M., Ghanavatinejad A., Bozorgmehr M., Shokri M. R., Nikoo S., Tavakoli M., Kazemnejad S., Shokri F., Zarnani A. H. Menstrual Blood-Derived Stromal Stem Cells Augment CD4+ T Cells Proliferation // *Avicenna J Med Biotechnol.* – 2018. – T. 10, № 3. – C. 183-191.
110. Luz-Crawford P., Torres M. J., Noël D., Fernandez A., Toupet K., Alcayaga-Miranda F., Tejedor G., Jorgensen C., Illanes S. E., Figueroa F. E., Djouad F., Houry M. The immunosuppressive signature of menstrual blood mesenchymal stem cells entails opposite effects on experimental arthritis and graft versus host diseases // *Stem Cells.* – 2016. – T. 34, № 2. – C. 456-69.
111. Schwab K. E., Gargett C. E. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium // *Hum Reprod.* – 2007. – T. 22, № 11. – C. 2903-11.
112. Masuda H., Anwar S. S., Bühring H. J., Rao J. R., Gargett C. E. A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells // *Cell Transplant.* – 2012. – T. 21, № 10. – C. 2201-14.
113. Gargett C. E., Schwab K. E., Deane J. A. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years // *Human Reproduction Update.* – 2016. – T. 22, № 2. – C. 137-163.
114. Bozorgmehr M., Gurung S., Darzi S., Nikoo S., Kazemnejad S., Zarnani A.-H., Gargett C. E. Endometrial and Menstrual Blood Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Biological Properties and Clinical Application // *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* – 2020. – T. 8.
115. Chen C., Song X. L., Wei W. X., Zhong H. Z., Dai J. J., Lan Z., Li F., Yu X. L., Feng Q., Wang Z. R., Xie H. L., Chen X. M., Zeng C. W., Wen B., Zeng L. P., Du H., Tang H. R., Xu C. L., Xia Y., Xia H. H., Yang H. M., Wang J., Wang J., Madsen L., Brix S., Kristiansen K., Xu X., Li J. H., Wu R. F., Jia H. J. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases // *Nature Communications.* – 2017. – T. 8.
116. Koks C. A., Dunselman G. A., de Goeij A. F., Arends J. W., Evers J. L. Evaluation of a menstrual cup to collect shed endometrium for in vitro studies // *Fertil Steril.* – 1997. – T. 68, № 3. – C. 560-4.
117. Musina R. A., Belyavski A. V., Tarusova O. V., Solovyova E. V., Sukhikh G. T. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* – 2008. – T. 145, № 4. – C. 539-543.
118. Meng X. L., Ichim T. E., Zhong J., Rogers A., Yin Z. L., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K. W., Thebaud B., Riordan N. H. Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population // *Journal of Translational Medicine.* – 2007. – T. 5.
119. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *nature.* – 1970. – T. 227, № 5259. – C. 680-685.
120. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1979. – T. 76, № 9. – C. 4350-4354.
121. Bjerrum O. J. Buffer systems and transfer parameters for semi dry electroblotting with a horizontal apparatus // *Analytical electrophoresis.* – 1986. – C. 315-327.
122. Viswanathan S., Shi Y., Galipeau J., Krampera M., Leblanc K., Martin I., Nolte J., Phinney D. G., Sensebe L. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature // *Cytotherapy.* – 2019. – T. 21, № 10. – C. 1019-1024.
123. Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // *Tissue Eng.* – 2001. – T. 7, № 2. – C. 211-28.
124. Khanjani S., Khanmohammadi M., Zarnani A. H., Akhondi M. M., Ahani A., Ghaempanah Z., Naderi M. M., Eghtesad S., Kazemnejad S. Comparative Evaluation of Differentiation Potential of Menstrual Blood- Versus Bone Marrow- Derived Stem Cells into Hepatocyte-Like Cells // *Plos One.* – 2014. – T. 9, № 2.
125. Mo Y. F., Wang Z. J., Gao J., Yan Y., Ren H. J., Zhang F. L., Qi N. A. M., Chen Y. T. Comparative study of three types of mesenchymal stem cell to differentiate into pancreatic beta-like cells in vitro // *Experimental and Therapeutic Medicine.* – 2021. – T. 22, № 3.

126. Tomasek J. J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier C., Brown R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2002. – T. 3, № 5. – C. 349-363.
127. Li J., Cen B., Chen S., He Y. MicroRNA-29b inhibits TGF- β 1-induced fibrosis via regulation of the TGF- β 1/Smad pathway in primary human endometrial stromal cells // *Mol Med Rep*. – 2016. – T. 13, № 5. – C. 4229-37.
128. Liu L., Chen G., Chen T., Shi W., Hu H., Song K., Huang R., Cai H., He Y. si-SNHG5-FOXF2 inhibits TGF- β 1-induced fibrosis in human primary endometrial stromal cells by the Wnt/ β -catenin signalling pathway // *Stem Cell Res Ther*. – 2020. – T. 11, № 1. – C. 479.
129. Szóstek-Mioduchowska A. Z., Lukasik K., Skarzynski D. J., Okuda K. Effect of transforming growth factor - β 1 on α -smooth muscle actin and collagen expression in equine endometrial fibroblasts // *Theriogenology*. – 2019. – T. 124. – C. 9-17.
130. Nasu K., Nishida M., Matsumoto H., Bing S., Inoue C., Kawano Y., Miyakawa I. Regulation of proliferation, motility, and contractivity of cultured human endometrial stromal cells by transforming growth factor-beta isoforms // *Fertil Steril*. – 2005. – T. 84 Suppl 2. – C. 1114-23.
131. Wu J., Jin L., Zhang Y., Duan A., Liu J., Jiang Z., Huang L., Chen J., Liu Z., Lu D., Dai Y. LncRNA HOTAIR promotes endometrial fibrosis by activating TGF- β 1/Smad pathway // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. – 2020. – T. 52, № 12. – C. 1337-1347.
132. Li J., Du S., Sheng X., Liu J., Cen B., Huang F., He Y. MicroRNA-29b Inhibits Endometrial Fibrosis by Regulating the Sp1-TGF- β 1/Smad-CTGF Axis in a Rat Model // *Reprod Sci*. – 2016. – T. 23, № 3. – C. 386-94.
133. Liu F., Zhu Z. J., Li P., He Y. L. Creation of a female rabbit model for intrauterine adhesions using mechanical and infectious injury // *J Surg Res*. – 2013. – T. 183, № 1. – C. 296-303.
134. van Kaam K. J., Schouten J. P., Nap A. W., Dunselman G. A., Groothuis P. G. Fibromuscular differentiation in deeply infiltrating endometriosis is a reaction of resident fibroblasts to the presence of ectopic endometrium // *Hum Reprod*. – 2008. – T. 23, № 12. – C. 2692-700.
135. Santamaria X., Isaacson K., Simón C. Asherman's Syndrome: it may not be all our fault // *Human Reproduction*. – 2018. – T. 33, № 8. – C. 1374-1380.
136. Evans J., Infusini G., McGovern J., Cuttle L., Webb A., Nebl T., Milla L., Kimble R., Kempf M., Andrews C. J., Leavesley D., Salamonsen L. A. Menstrual fluid factors facilitate tissue repair: identification and functional action in endometrial and skin repair // *Faseb j*. – 2019. – T. 33, № 1. – C. 584-605.