

МРНТИ 76.29.48

ЭНДОМЕТРИАЛЬНАЯ КУЛЬТУРА ЧЕЛОВЕКА: ИНВАЗИОННЫЕ СВОЙСТВА

Т.С. Клейменова¹, А.О. Дробинцева¹, В.О. Полякова¹, Ю.С. Крылова¹, А.А. Цыпурдеева¹

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

¹«Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта»
Россия, Москва

АННОТАЦИЯ

Наружный генитальный эндометриоз это женское гинекологическое заболевание, характеризующееся ростом ткани, сходной с эндометрием за пределами полости матки. Это обусловлено протеолитическими свойствами стромы внутренней оболочки матки. Миграция и инвазия являются ключевыми свойством живых клеток и играют решающую роль в нормальном развитии организма, иммунного ответа и патологических процессов, таких как метастазирование при раке и воспалительные процессы. В нашем исследовании был проведен анализ инвазии клеточных культур, основанный на измерении подвижности клеток и активности движения клеток по градиенту химио-аттрактанта. Было показано, что в контроле количество клеток, прошедших через трансэробный фильтр и прикрепившихся на поверхности, варьировало от 4,6 до 16,3. В клеточной культуре, полученной при эндометриозе, эти цифры практически не отличались и равнялись 6,5-12,8. Добавление перитонеальной жидкости в нижнюю камеру не влияло на миграционные способности клеток контрольной группы, однако усиливало инвазию в группе с эндометриозом.

Ключевые слова: эндометриальная культура клеток, наружный генитальный эндометриоз, миграция, инвазия

ВВЕДЕНИЕ

Наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) является одной из наиболее загадочных и нерешенных проблем современной гинекологии. Заболевание прочно удерживает одно из лидирующих мест как в структуре гинекологической патологии, так и в структуре женского бесплодия. Несмотря на многолетние клинические и экспериментальные исследования эндометриоза, достоверных сведений об этиологии и патогенезе заболевания известно достаточно мало. НГЭ характеризуется ростом ткани, сходной с эндометрием за пределами полости матки, что обусловлено протеолитическими свойствами стромы внутренней оболочки матки. В этом механизме задействованы различные протеазы, в том числе металлопротеиназы 2 и 9 типов [1, 2]. Очаги эндометриоза могут быть локализованы в слизистой оболочке, мышечной ткани, легких, серозе, клетчатке, коже и даже в костной ткани и глазах [3]. Так же эндометриоз обладает способностью метастазировать - по одной из теорий распространение клеток осуществляется током крови или лимфы. Различные молекулы были интенсивно исследованы как потенциальные терапевтические цели, среди них ароматаза P450 [4], эстрогены [5], цитокины [6], фактор некроза опухоли [7] и др. Способность эндометриоидной ткани к инфильтративному росту и проникновению в окружающую ткань с ее последующей деструкцией, отсутствие вокруг очагов эндометриоза соединительно-тканной капсулы, тенденция к метастазированию и другие признаки сближают эндометриоз с опухолевым процессом.

Лечение эндометриоза относится к одной из наиболее сложных проблем в современной гинекологии, которая, несмотря на значительное количество исследований, остаётся окончательно не решенной. Активно изучается

как хирургический, так и гормональные методы лечения эндометриоза, но их совместное применение остается малоэффективным.

Эндометрий играет одну из самых важных ролей в системе женской половой сферы. Он неразрывно связан с работой яичников и матки, также его состояние сильно зависит от внешних факторов. Качество эндометрия определяет возможность женщины забеременеть и выносить ребёнка, особенно важным этот момент считается в первые недели беременности. Первые клеточные культуры эндометрия были выделены в 70-х годах прошлого века [8], но до сих пор эта модель для изучения взаимодействия клеток и оценки действия лекарственных препаратов остается актуальной. Культура эндометрия использовалась так же для изучения инвазии бластоцисты в стромальный слой эндометрия [9], исследования ориентации эмбриона в полости матки [10] и для получения мезенхимальных стволовых клеток [11].

Изучение миграции клеток в исследованиях эндометриоза представляет особый интерес, поскольку одной из основных проблем НГЭ является образование эндометриоидных гетеротопий. Эндометриоидные гетеротопии в виде желез и стромы эндометрия локализуются вне матки, они сходны по строению и функции с эндометриальной тканью.

Целью данного исследования являлось выделение клеточной культуры эндометрия от пациенток с наружным генитальным эндометриозом и дальнейшая характеристика миграционных и инвазивных свойств полученной культуры.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на материале у 7 пациенток: весь материал был разделен на 2 группы: контрольную

(n=4) и группу с НГЭ. В группу с НГЭ входил материал от пациенток с НГЭ I стадии (n=1) и IV стадии (n=2). В контрольной группе биопсия эндометрия выполнялась с диагностической целью путем проведения гистеро- или лапароскопии и пайпель-биопсии. Способ выделения и результат выделения клеточной культуры не зависел от метода получения материала. Материал был получен от пациенток возрастом от 23 до 38 лет. Все доноры проходили обследование в отделении оперативной гинекологии. В контрольной группе пациентки имели регулярный менструальный цикл. При обследовании у пациенток инфекций репродуктивного тракта выявлено не было. Получение материала для выделения клеточной культуры проводилось на 21-22 день менструального цикла (ДМЦ) в пяти случаях и на 7-12 ДМЦ в двух случаях.

Методика выделения эндометриальной клеточной культуры отработана и подробно описана в статье Э.К. Айламазяна и соавт. [12]. В данной работе в качестве фермента использовали коллагеназу II типа (Gibco), культивирование клеток проводилось в среде DMEM/F-12 с 10% FBS, оптимальная концентрация при высаживании на флакон равнялась 1×10^3 клеток в мл. Применение описанной методики позволяет получить культуру эндометриальных клеток стромального и железистого происхождения для широко спектра дальнейших исследований. Для образования монослоя культуре клеток требовалось 1-2 дня.

Криоконсервацию культуры осуществляли в 10% DMSO на сыворотке, разливали суспензию клеток в криовials с концентрацией не менее 1×10^6 . Криовials переносили в контейнер для замораживания при -80°C (Mr.Frosty, Nalgene). Через сутки клетки переносили в сосуды Дюара с жидким азотом для длительного хранения. Процедуру оттаивания проводили в водяной бане при 37°C . Жизнеспособность размороженной культуры определяли с помощью красителя трипанового синего и равнялась 80-90%.

Для оценки инвазии клеток применялись вставки Falcon в 24-луночные планшеты (BD Biosciences, США) с диаметром пор 8 мкм. Суспензию эндометриальных клеток в среде DMEM/F-12 вносили в верхнюю камеру (вставку), а в нижнюю камеру (лунку) вносили фетальную телячью сыворотку, а во второй серии экспериментов в нижнюю камеру вводили аутологичную перитонеальную жидкость. Планшеты инкубировали 10 часов при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 и затем подсчитывали

количество клеток, проникших через поры вставки в нижнюю камеру.

Тест на застание раны (Scratch-тест) проводили с помощью μ -Dish 35 mm, high (Ibidi). Культура высаживалась в две лунки в концентрации 35,000 кл/мл, монослой доводили до 90-95%-й конfluence, наносили на монослой "рану", удалив специальную рамку из чашки Петри. Открепившиеся клетки удаляли с помощью DPBS, и добавляли свежую среду. Сканирование проводили через каждые 12 часов.

Для статистической оценки различий значений признаков, имеющих непрерывное распределение, применяли ранговый U-критерий Манна-Уитни в программе «Statistica 7.0». Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Миграция и инвазия являются важными свойством живых клеток и играют решающую роль в нормальном развитии организма, иммунного ответа и патологических процессов, таких как метастазирование при раке и воспалительные процессы [13, 14, 15]. Изучение миграции клеток в исследованиях эндометриоза представляет особый интерес, поскольку одной из основных проблем НГЭ является образование эндометриоидных гетеротопий. В нашем исследовании был проведен анализ инвазии клеточных культур, основанный на измерении подвижности клеток и активности движения клеток по градиенту химио-аттрактанта (1 - фетальная телячья сыворотка, 2 - аутологичная перитонеальная жидкость). Было показано, что в контрольной группе количество клеток, прошедших через трансэробный фильтр (пора 8 мкм) и прикрепившихся на поверхности, варьировало от 4,6 до 16,3 в 5-ти полях зрения (при увеличении $\times 40$). В клеточной культуре, полученной при эндометриозе, эти цифры практически не отличались и равнялись 6,5-12,8 (рис. 1). Добавление перитонеальной жидкости в нижнюю камеру не влияло на миграционные способности клеток контрольной группы, однако усиливало инвазию в группе с НГЭ. Полученные данные объясняются повышением в перитонеальной жидкости пациенток с НГЭ числа цитокинов, активирующих ангиогенез (ИЛ1 β , ИЛ6 и ИЛ8) и стимулирующих адгезию клеток эндометрия к мезотелию брюшины (ФНО α) [16], а также факторов роста (VEGF) [17], усиливающих инвазивные свойства культуры клеток.

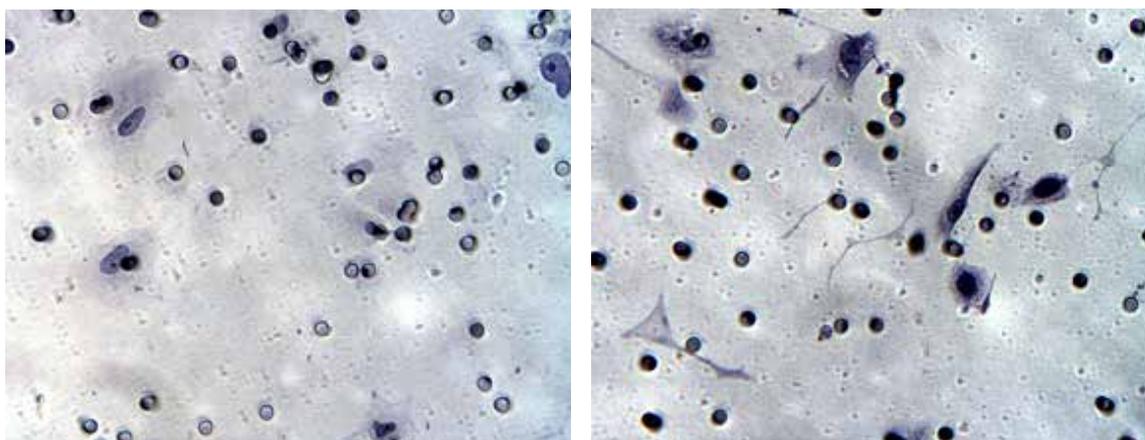


Рисунок 1 - Анализ инвазии клеточных культур по химио-аттрактанту; слева: контрольная клеточная культура эндометрия, справа: культура эндометрия от пациенток с НГЭ; увеличение $\times 40$.

Ранее исследователями не было выявлено существенных различий между пролиферативной активностью клеток при эндометриозе и у здоровых пациенток [18]. Мы изучали подвижности этих двух культур клеток с помощью Scratch-теста. Изменения числа клеток в ране, их местоположение и форму фиксировали с помощью цифровой фотокамеры. При анализе полученного материала установлено, что клеточные линии принципиально различаются между собой по миграционной способности. В контрольной культуре клеток через 24 часа площадь раны составляла 27,29% от площади препарата, через 48 часа – 17,61%. В культуре от пациенток с НГЭ площадь раны через 24 часа составляла 20,77%, через 48 часа – 8,21%. Стоит отметить, что на эти различия могут влиять индивидуальные особенности пациенток, от которых был получен материал эндометрия: гормональный фон, возраст, особенности течения эндометриоза, сопутствующие заболевания и т.д.

Обе культуры демонстрируют одинаковый тип движения по субстрату: отмечается коллективная миграция, то есть клетки переднего края тянут за собой остальной монослой, т.к. его клетки находятся в плотном контакте. Одиночные клетки практически не покидают монослой и в «рану» не мигрируют, а находящиеся в «ране» через мезенхимно-эпителиальный переход примыкают к монослою.

Установлен высокий пролиферативный потенциал культуры; большая жизнеспособность после криоконсервации (90-95%). Во всех культивируемых образцах эндометрия преобладала фибробластоподобная морфология клеток, что дало нам основание предполагать отсутствие контаминации эндометриальной линии со стороны других клеточных популяций.

Уникальный молекулярный профиль клеток эндометрия является неблагоприятным фактором, так как позволяет им прикрепляться, имплантироваться и приживаться в других тканях, формируя эндометриоидные очаги.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Добавление перитонеальной жидкости в нижнюю камеру не влияло на миграционные способности клеток контрольной группы, однако усиливало инвазию в группе с НГЭ. Полученные данные объясняются повышением в перитонеальной жидкости пациенток с НГЭ числа цитокинов, активирующих ангиогенез (ИЛ1 β , ИЛ6 и ИЛ8) и стимулирующих адгезию клеток эндометрия к мезотелию брюшины (ФНО α), а также факторов роста (VEGF), усиливающих инвазивные свойства культуры клеток.

В результате экспериментов установлено, что клетки эндометрия при НГЭ обладают повышенной скоростью движения по субстрату. Так как многие молекулярные мишени связаны с миграционными и инвазивными свойствами, этим тестам нужно уделять особое внимание.

В результате проведенного исследования был отработан ферментативный метод получения эндометриальной клеточной культуры от пациенток с НГЭ и от здоровых женщин. Во всех культивируемых образцах эндометрия преобладала фибробластоподобная морфология клеток, что дало нам основание предполагать отсутствие контаминации эндометриальной линии со стороны других клеточных популяций. Планируется продолжение исследования в этом направлении, увеличение выборки и применение иммуноцитохимического анализа.

В дальнейшем необходимо увеличить выборку, оценить экспрессию молекулярных мишеней в эндометриальных клетках в разных фазах менструального цикла и в разных возрастных группах, а также получить эндометриодные клетки из гетеротопий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takino T, Koshikawa N, Miyamori H, et al. «Cleavage of metastasis suppressor gene product KiSS-1 protein/ metastasin by matrix metalloproteinase». *Oncogene*. 2003;22:4627–4626
2. Qiao C., Wang C.H., Shang T. Clinical significance of kiss- 1 and matrix metalloproteinase- 9 expression in trophoblasts of women with preeclampsia and their relation to perinatal outcome in neonates. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2005; 40: 585–590.
3. Dongxu Z, Fei Y, Xing X, Bo-Yin Z, Qingsan Z. Low back pain tied to spinal endometriosis. *Eur Spine J*. 2014 May;23 Suppl 2:214-7.
4. Молотков А.С., Подходы к оценке ароматазной активности в эндометриальных гетеротопиях. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2 (42), 2013. с 25-28.
5. Ярмолинская М.И., Айламазян Э.К. Наружный генитальный эндометриоз. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2010, с. 45-48
6. Иванов И.А. и др. Цитокины макрофагального звена при эндометриозе. *Цитокины и воспаление*. 2013. Т. 12. № 1–2. С. 88–93
7. Braundmeier A. et al. Cytokines regulate matrix metalloproteinases in human uterine endometrial fibroblast cells through a mechanism that does not involve increases in extracellular matrix metalloproteinase inducer // *Am. J. Reprod. Immunol*. 2006. Vol. 56 (3). P. 201–214.
8. Hiratsu, T. In vitro cultivation of human endometrium and the influences of steroid hormones on a cell line derived from the endometrium. 1968. *Kobe J. Med. Sci*. 14: 29–48.
9. Carver J, Martin K, Spyropoulou I, Barlow D, Sargent I, Mardon H. An in-vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst. *Hum Reprod*. 2003 Feb;18(2):283-90.
10. Simón C, Valbuena D. Embryonic implantation. *Ann Endocrinol (Paris)*. 1999 Jul;60(2):134-6.
11. Шилина М. А., Домнина А. П., Кожухарова И. В., Зенин В. В., Анисимов С. В., Никольский Н. Н., Т. М. Гринчук. Характеристика культуры эндометриальных мезенхимных стволовых клеток, полученных от пациентки с аденомиозом. *Цитология*, 57(11):771–779, 2015.
12. Айламазян Э.К., Дурнова А.О., Полякова В.О., Судалина М.Н., Кветной И.М. Ко-культивирование эмбриона человека с эндометрием: оптимизация экстракорпорального оплодотворения// *Журнал акушерства и женских болезней* – 2012 – Т.LXI, №4. С. 16–22.
13. Castellone RD, Leffler NR, Dong L, Yang LV. Inhibition of tumor cell migration and metastasis by the proton-sensing GPR4 receptor. *Cancer Lett*. 2011;312(2):197–208.
14. Yoshida M, Yoshida K. Sperm chemotaxis and regulation of flagellar movement by Ca₂. *Mol. Hum. Reprod*. 2011;17(8):457–465.
15. Radu CG, Yang LV, Riedinger M, Au M, Witte ON. T cell chemotaxis to lysophosphatidylcholine through the G2A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2004;101(1):245–250.
16. Павлов Р.В., С.А. Сельков; Уровень цитокинов в перитонеальной жидкости женщин с наружным генитальным эндометриозом, *Журнал акушерства и женских болезней*, 2008, 55-58с.
17. Kianpour M., Nematbakhsh M. et al. Serum and peritoneal fluid levels of vascular endothelial growth factor in women with endometriosis // *International Journal Fertility Sterility*. 2013. Vol.7. № 2. P. 96–99.
18. An-Pei Kao, Kai-Hung Wang, Chia-Cheng Chang et al. Comparative study of human eutopic and ectopic endometrial mesenchymal stem cells and the development of an in vivo endometriotic invasion model // *Fertil. Steril.* – 2011. – Vol. 95, No. 4. – P. 1308-1315.

REFERENCES

1. Takino T, Koshikawa N, Miyamori H, et al. «Cleavage of metastasis suppressor gene product KiSS-1 protein/ metastasin by matrix metalloproteinase». *Oncogene*. 2003;22:4627–4626
2. Qiao C., Wang C.H., Shang T. Clinical significance of kiss- 1 and matrix metalloproteinase- 9 expression in trophoblasts of women with preeclampsia and their relation to perinatal outcome in neonates. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2005; 40: 585–590.
3. Dongxu Z, Fei Y, Xing X, Bo-Yin Z, Qingsan Z. Low back pain tied to spinal endometriosis. *Eur Spine J*. 2014 May;23 Suppl 2:214-7.
4. Molotkov A.S., Podhodyi k otsenke aromataznoy aktivnosti v endometrialnyih geterotopiyah. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii*. 2 (42), 2013. s 25-28.
5. Yarmolinskaya M.I., Aylamazyan E.K. Naruzhnyiy genitalnyiy endometrioz. *Zhurnal akusherstva i zhenskih bolezney*. 2010, s. 45-48
6. Ivanov I.A. i dr. Tsitokinyi makrofagalnogo zvena pri endometrioze. *Tsitokinyi i vospalenie*. 2013. T. 12. # 1–2. S. 88–93
7. Braundmeier A. et al. Cytokines regulate matrix metalloproteinases in human uterine endometrial fibroblast cells through a mechanism that does not involve increases in extracellular matrix metalloproteinase inducer // *Am. J. Reprod. Immunol*.

2006. Vol. 56 (3). P. 201–214.
8. Hiratsu, T. In vitro cultivation of human endometrium and the influences of steroid hormones on a cell line derived from the endometrium. 1968. Kobe J. Med. Sci. 14: 29–48.
 9. Carver J, Martin K, Spyropoulou I, Barlow D, Sargent I, Mardon H. An in-vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst. Hum Reprod. 2003 Feb;18(2):283-90.
 10. Simón C, Valbuena D. Embryonic implantation. Ann Endocrinol (Paris). 1999 Jul;60(2):134-6.
 11. Shilina M. A., Domnina A. P., Kozhuharova I. V., Zenin V. V., Anisimov S. V., Nikolskiy N. N., T. M. Grinchuk. Harakteristika kulturyi endometrialnyih mezenhimnyih stvolovyih kletok, poluchennyih ot patsientki s adenomiozom. Tsitologiya, 57(11):771–779, 2015.
 12. Aylamazyan E.K., Durnova A.O., Polyakova V.O., Sudalina M.N., Kvetnoy I.M. Ko-kultivirovanie embriona cheloveka s endometriem: optimizatsiya ekstrakorporalnogo oplodotvoreniya// Zhurnal akusherstva i zhenskih bolezney – 2012 – T.LXI, #4. S. 16–22.
 13. Castellone RD, Leffler NR, Dong L, Yang LV. Inhibition of tumor cell migration and metastasis by the proton-sensing GPR4 receptor. Cancer Lett. 2011;312(2):197–208.
 14. Yoshida M, Yoshida K. Sperm chemotaxis and regulation of flagellar movement by Ca²⁺. Mol. Hum. Reprod. 2011;17(8):457–465.
 15. Radu CG, Yang LV, Riedinger M, Au M, Witte ON. T cell chemotaxis to lysophosphatidylcholine through the G2A receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004;101(1):245–250.
 16. Pavlov R.V., S.A. Selkov; Uroven tsitokinov v peritonealnoy zhidkosti zhenschin s naruzhnyim genitalnyim endometriozom, Zhurnal akusherstva i zhenskih bolezney, 2008, 55-58s.
 17. Kianpour M., Nematbakhsh M. et al. Serum and peritoneal fluid levels of vascular endothelial growth factor in women with endometriosis //International Journal Fertility Sterility. 2013. Vol.7. № 2. P. 96–99.
 18. An-Pei Kao, Kai-Hung Wang, Chia-Cheng Chang et al. Comparative study of human eutopic and ectopic endometrial mesenchymal stem cells and the development of an in vivo endometriotic invasion model // Fertil. Steril. – 2011. – Vol. 95, No. 4. – P. 1308-1315.

ТҮЙІНДЕМЕ

АДАМНЫҢ ИНДОМЕТИКАЛЫҚ МӘДЕНИЕТІ: ИНВАЗИЯЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІ

T.S. Клименов, А.О. Дробинцев, В.О. Полякова, Ю.С. Крылов, А.А. Цыпурдеева

Федералдық мемлекеттік бюджеттік мекеме
акушерлік, гинекология және репродуктивтік медицина ғылыми-зерттеу институты. D.O. Отт
Ресей Мәскеу

Сыртқы жыныс безінің эндометриозы жатырдың сыртында эндометрияға ұқсас мата өсуімен сипатталатын әйел жыныс ауруы. Бұл жатырдың астарының стомасының протеолитикалық қасиеттеріне байланысты. Көші-қон және шабуыл - тірі жасушалардың негізгі қасиеттері және организмнің қалыпты дамуы, иммундық реакция және қатерлі ісік метастазасы және қабыну процестері сияқты патологиялық процестерде шешуші рөл атқарады. Зерттеу барысында жасушалық қозғалысқа талдау жасалды, ол клеткалардың қозғалғыштығын және химиялық тартымды градиент бойындағы жасуша қозғалысын өлшеуге негізделген.

Басқаруда трандиобиялық сүзгіден өтіп, бетіне жабысатын ұяшықтардың саны 4,6-дан 16,3-ке дейін өзгерген. Эндометриозбен алынған жасуша мәдениетінде бұл көрсеткіштер шамамен бірдей болды және 6,5-12,8 болды. Төменгі камераға перитонеальды сұйықтықты қосу бақылау тобындағы жасушалардың көші-қон қабілеттеріне әсерін тигізбеді, бірақ ол эндометриозбен ауыратын топқа шабуылды күшейтеді.

Түйін сөздер: эндометриялы жасушалық мәдениет, сыртқы жыныстық эндометриоз, көші-қон, шабуыл

SUMMARY

ENDOMETRIUM CULTURE OF THE HUMAN: RESEARCH OF INVASIVE

T.S. Kleimenova, A.O. Drobintseva, V.O. Polyakova, I.S. Krylova, A.A. Tsipurdieva

IFSBISI “The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology
named after D.O.Ott”

External genital endometriosis is a female gynecological disease characterized by tissue growth similar to endometrium outside the uterus. This is due to the proteolysis properties of the stroma of the uterine lining. Migration and invasion are key properties of living cells and play a crucial role in the normal development of the body, the immune response and pathological processes such as cancer metastasis and inflammatory processes. In our study, an analysis of cell culture invasion was carried out, based on the measurement of cell motility and the activity of cell movement along a chemio-attractant gradient. It was shown that in the control the number of cells that passed through the transerobny filter and adhered to the surface varied from 4.6 to 16.3.

In the cell culture obtained with endometriosis, these figures were almost the same and were 6.5–12.8. The addition of peritoneal fluid to the lower chamber did not affect the migration abilities of the cells of the control group, however, it enhanced invasion in the group with endometriosis.

Key words: *culture of human endometrial cells, endometriosis, cell culture assay, invasion*