На правах рукописи

КЛЕЙМЕНОВА

Татьяна Сергеевна

КИССПЕПТИНЫ И МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ КАК ФАКТОРЫ ИНВАЗИИ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта».

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор РАН **Полякова Виктория Олеговна**

Официальные оппоненты: **Линькова Наталья Сергеевна** доктор биологических наук, автономная некоммерческой организации научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», лаборатория молекулярных механизмов старения, заведующая

Печеникова Виктория Анатольевна доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии, профессор; гинекологическое отделение №2 клиники им. Петра Великого, заведующая

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук.

Защита диссертации состоится «14» октября 2020 г. в 15-00 часов на заседании диссертационного совета Д208.087.01 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, д.2).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России (194100, г. Санкт-Петербург, ул. Кантемировская, д. 16) и на сайте ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России: http://gpmu.org

Автореферат разослан «___» _____2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор Кульбах О.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Эндометриоз – заболевание, характеризующееся развитием внутриматочной ткани (эндометрия) вне матки, протекающее с выраженным болевым синдромом и бесплодием (Bulum S.E., 2009). Этиология эндометриоза до сих пор неизвестна. В мире 176 миллионов женщин страдают этой болезнью, с каждым годом их число не уменьшается. (Adamson G.D., 2010). Эндометриоз подразделяют на генитальный и экстрагенитальный, а генитальный в свою очередь – на внутренний, аденомиоз (эндометриоз тела матки) и наружный. При наружном генитальном эндометриозе эндометриоидные гетеротопии локализуются в области наружных половых органов: во влагалище, ретроцервикальной области, яичниках, маточных трубах, брюшине малого таза. Частота и выраженность клинических проявлений различных форм эндометриоидной болезни определяются органной локализацией, волнообразным, асинхронным течением с различной направленностью формообразовательных процессов (Печеникова В.А., 2008).

Не смотря на то, что исследования по изучению этиологии и лечению эндометриоза постоянно ведутся, многие аспекты пока не ясны. Так семейство белков кисспептинов и их рецептор отвечают за половое созревание, имплантацию эмбриона и регулирует выработку стероидных гормонов, но их роль в патогенезе эндометриоза до сих пор не изучена.

Белок кисспептин (KISS1, Metastin) кодируется геном *KISS1*, первоначально известным, как ген, супрессирующий метастазирование меланомы. (Lee J.H., 1996). У человека он был верифицирован в качестве лиганда для рецептора связанного с G-белком 54 (GPR54), в настоящее время называемого KISS1R. Белок представляет собой пептид, содержащий 145 аминокислотных остатков. Многие исследования позволили установить, что KISS-10 играет важную роль в процессе ангиогенеза, подавляя его (Francis V.A., 2014; Ramaesh T., 2010; Cho S.G., 2009). Известно, что механизм, по которому KISS1 влияет на метастазирование, связан с клеточным циклом, так же было показано, что рецептор к кисспептину влияет на уровень апоптоза (Becker J.A., 2005). Многими исследователями показано, что в развитии эндометриоидных гетеротопий большую роль играют матриксные металлопротеиназы. В исследованиях (Sawicki G., 2003; Szymanowski K., 2007) установлено подавление MMP-2 и MMP-9, белком KISS1, которые в свою очередь играют важную роль во вторжении клеток эндометрия в различные ткани и органы.

Создание антогониста KISS1 открывает перспективные возможности для исследования физиологической и патофизиологической роли KISS1 в регулировании репродуктивной системы. Также антогонисты могут использоваться в лечении гормон-зависимых заболеваниях репродуктивной системы, таких как преждевременное половое созревание, эндометриоз и метастазирущий рак простаты (Messager S., 2005).

Степень разработанности темы исследования

В отечественной и зарубежной литературе насчитывается большое количество работ, посвященных проблемам изучению эндометриоза и его патогенеза. Работ посвященных роли системы KISS1/KISS1R при эндометриозе в отечественной литературе практически не встречается, но есть несколько работ зарубежных исследователей (Makri A., 2012; Cejudo Roman A., 2012; Baba T., 2012; Timologou A., 2016; Kolioulis I., 2017).

Многими исследователями показано, что в развитии эндометриоидных гетеротопий большую роль играют матриксные металлопротеиназы. В исследованиях (Takino T., 2003; Shang T., 2005) установлено подавление MMP-2 и MMP-9, белком KISS1, которые в свою очередь играют важную роль в процессе инвазии эндометриальных клеток в различные ткани. Но работа, посвященная совместному изучению кисспептинов и матриксных металлопротеиназ при эндометриозе, не выполнялась до сих пор.

Не смотря на достаточное количество работ, подробный механизм до сих пор остается недостаточно изученным. В данный момент отсутствуют данные, отвечающие на вопрос о роли системы KISS1/KISS1R при наружном генитальном эндометриозе: неизвестно в каких группах является ключевым фактором в формировании болезни; зависит ли экспрессия от дня менструального цикла; как влияет на экспрессию MMP; не были проведены исследования по изучению клеточных культур полученных из биопсий эндометрия, полученных от пациенток с НГЭ

Цель исследования:

изучить экспрессию кисспептина, его рецептора, матриксных металлопротеиназ-2,-9 типов в эктопическом и эутопическом эндометрии и клеточных культурах эндометрия, полученных от пациенток с наружным генитальным эндометриозом.

Задачи исследования:

1. Выделить и охарактеризовать клеточную культуру эндометрия от пациенток с наружным генитальным эндометриозом.
2. Оценить уровень экспрессии кисспептина, рецептора к кисспептину, матриксных металлопротеиназ-2,-9, уточнить локализацию белков в клеточной культуре и ткани эктопического и эутопического эндометрия.
3. Выявить корреляции уровня экспрессии матриксной металлопротеиназы-2 и матриксной металлопротеиназы-9, кисспептинов и рецептора к кисспептинам, как регуляторов процесса инвазии, в ткани эктопического и эутопического эндометрия.
4. Верифицировать экспрессию кисспептина и его рецептора в ткани эндометрия и эндометриальных гетеротопий с брюшины при наружном генитальном эндометриозе и в контрольной группе.

Научная новизна

Впервые методом конфокальной лазерной иммунофлуоресцентной сканирующей микроскопии проведена верификация и оценка уровня экспрессии кисспептина, его рецептора, матриксной металлопротеиназы 2 и 9 типов при наружном генитальном эндометриозе в клеточной культуре и ткани эктопического и эутопического эндометрия. При этом верификация экспрессии указанных молекулярных маркеров осуществлена как при легкой, так и тяжелой форме наружного генитального эндометриоза, что ранее не проводилось. Установлены корреляционные механизмы экспрессии кисспептина и матриксных металлопротеиназ при наружном генитальном эндометриозе. Впервые на эндометриальных клеточных линиях, полученных от пациенток с наружным генитальным эндометриозом, проведены исследования миграционной и инвазивной способности клеток.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты позволяют расширить представления о механизмах развития наружного генитального эндометриоза и эндометриальных гетеротопий. Изучение и верификация экспрессии белков KISS1, KISS1R, MMP-2 и MMP-9 в эндометриальной клеточной линии позволяет оптимизировать способ тестирования лекарств и препаратов на модели наружного генитального эндометриоза.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационной работы явилось последовательное применение методов научного познания. Для реализации цели исследования были использованы иммуногистохимические, иммунофлуоресцентные, морфометрические и статистические методы. Клинико-морфологическое исследование проведено у пациенток, проходивших обследование на базе ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта». Для решения поставленных задач были включены 45 пациенток репродуктивного возраста. Методом предварительного отбора были сформированы 4 основные группы и группа контроля. I группа – 10 пациенток с НГЭ-I ст., II группа – 10 пациенток с НГЭ-II ст., III группа – 10 пациенток с НГЭ-III ст., IV группа – 10 пациенток с НГЭ-IV ст. V группа (контрольная) – 5 пациенток без НГЭ, воспалительных заболеваний органов малого таза, миом матки, отсутствия гормонального лечения в течении 6 месяцев.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Снижение уровня кисспептина и его рецептора в эутопическом и эктопическом эндометрии свидетельствует о роли этих белков в патогенезе заболевания. Исследование роли системы KISS1/KISS1R открывает перспективные возможности оценки патофизиологической роли этих белков в регуляции репродуктивной системы.
2. Увеличение активности MMP-2 и MMP-9 способствует патогенезу эндометриоза, а снижение уровня кисспептина может ослаблять

действие матриксных металлопротеиназ, тем самым позволяя повысить деградацию внеклеточного матрикса.

3. Модифицирование методики выделения клеточной культуры эндометрия позволяет получение модельного объекта для изучения наружного генитального эндометриоза, а также других форм этого заболевания и оценки влияния различных фармакологических препаратов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки), изучающей закономерностей цито- и гистогенеза, строения и функции клеток и тканей (пункт 1), молекулярные, иммунологические и физиологические аспекты изучения клеток многоклеточных, малоклеточных и одноклеточных организмов в норме и патологии (пункт 6), разработка экспериментальных моделей, методов цитологической диагностики, морфометрии, маркерной гисто- и цитохимии и др. (пункт 7).

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в качестве нового метода культивирования федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, в учебный процесс кафедры гистологии, медицинской биологии, геронтологии частного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский медико-социальный институт».

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты диссертационного исследования достоверны и обоснованы, что обеспечивается репрезентативностью и достаточным объемом изученного материала, использованием широкого спектра современных методов исследования, адекватных решению поставленных задач, корректным применением статистических методов обработки полученных данных.

Материалы диссертации доложены на VI ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов «Репродуктивная медицина: взгляд молодых-2015» (Санкт-Петербург, апрель 2015 г.), на Международной научной конференции научного парка СПГБУ «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину» (Санкт-Петербург, ноябрь 2015г.), на Всемирном конгрессе «Международное общество гинекологической эндокринологии» (Флоренция, март 2016 г.), на XI Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Санкт-Петербург, сентябрь 2017 г.), на Международной конференции «Репродуктивная медицина: взгляд молодых - 2018» (Санкт-Петербург, апрель 2018 г.), на Всероссийской конференции, посвященной 160-летию кафедры

патологической анатомии ВМедА им. С.М. Кирова. (Санкт-Петербург, апрель 2019 г.).

Личный вклад автора в проведенные исследования

Работа выполнена в лаборатории клеточной биологии отдела патоморфологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта».

Автором совершалось самостоятельное планирование работы и выполнение исследований по всем главам диссертации. Осуществлен анализ обзора зарубежной и отечественной литературы, вынесена рабочая гипотеза, определены цели и задачи исследования. Изложены этапы и методы исследования. Лично автором выполнялись все этапы проведения диссертационного исследования, исключая забор материала, проведение иммуногистохимических, цитологических исследований и анализ полученных данных. Автором лично выделены клеточные культуры из ткани эндометрия, проведено иммуноцитохимическое исследование, Scratch-тест и анализ миграции клеток. Проведены иммуногистохимические исследования 90 образцов эктопического и эутопического эндометрия.

Публикации

Результаты диссертационной работы отражены в 26 печатных работах, их них 3 – публикации в ведущих рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикаций основных результатов диссертационных исследований и 1 публикация в журнале, входящем в международную реферативную базу данных Scopus, 1 методическое пособие, 21 статья и тезис в других журналах и изданиях.

Объем и структура диссертации

Работа изложена в соответствии с существующими требованиями ГОСТ Р 7.0.11–2011 на 115 страницах компьютерного текста и включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, список условных сокращений, список использованной литературы. В диссертационной работе представлено 6 таблиц и 37 рисунков, из которых 11 — микрофотографии. Список литературы содержит 174 источников, из них 13 отечественных и 161 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Работа была разделена на 2 этапа: иммуногистохимический анализ и исследование клеточных культур. Объектом для иммуногистохимического исследования была выбрана ткань эндометрия из полости матки, а также из эндометриальные гетеротопии на брюшине малого таза, полученные из архива отдела патоморфологии ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта». В исследование были включены 40 женщин с НГЭ. Критерием включения в группу исследования явились: наличие подтвержденного диагноза НГЭ I-IV ст., возраст от 23 до 38 лет.

В контрольной группе изучалась ткань эндометрия и брюшины, взятая в диагностических целях. После гистологического исследования НГЭ и других заболеваний не было выявлено, в связи, с чем этот материал был включен в контрольную группу. От всех пациенток было получено информативное согласие.

Исследование клеточных культур проводили на материале у 7 пациенток: весь материал был разделен на 2 группы: контрольную (n=4) и группу с НГЭ (n=3). В группу с НГЭ был включен 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. Работа одобрена Локальным этическим комитетом ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта».

Иммуногистохимический анализ

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) проводили на парафиновых срезах толщиной 5 мкм, которые помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина (Sigma). В качестве системы визуализации использовали Mouse and Rabbit Specific HRP Detection IHC Kit (abcam). Иммуногистохимический метод исследования включал: количественную и качественную оценку экспрессии кисспептинов (KISS1), рецептора к кисспептинам (KISS1R), матриксной металлопротеиназы-2 (MMP-2) и матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) в биоптатах эндометрия. Микропрепараты исследовали под микроскопом при увеличении 100×, 200× и 400× с целью получения общего представления о результатах ИГХ реакции. Количественную оценку результатов иммуногистохимической реакции проводили на микрофотографиях, полученных с помощью системы фиксации микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Olympus и камеры Olympus BX46 и программного обеспечения «CellSens 47 Entry».

Иммунофлуоресцентный анализ

Для получения первичной клеточной культуры из каждого образца эндометрия ферментативным путем выделяли по одной клеточной линии. Для обнаружения белков в клеточных культурах были использованы вторичные антитела с флуоресцентной меткой. Клеточные культуры фиксировали 4% параформальдегиде с последующей промывкой фосфатно-буферным раствором, далее пермеабилизовали 0,1% раствором Triton X-100 (Биофлот). В качестве вторичных антител использовали антитела, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 647 (1:1000, Abcam).

Методы статистического анализа

Статистическая обработка проводилась в программе «Excel 2010. Microsoft Office» (Microsoft Corporation, США) и в аналитической программе "Statistica 10.0" (Statsoft Inc., Tulsa, США). Методы дескриптивной статистики включали в себя оценку среднего арифметического (M), средней ошибки среднего значения (m) для признаков, имеющих непрерывное распределение, а также частоты встречаемости признаков с дискретными значениями. С помощью U-критерия Манна–Уитни были попарно сравнены выборки показателей относительной

площади экспрессии и оптической плотностью для всех подгрупп. Значение p<0,05 (5%) было принято как статистически значимое.

Для определения наличия и характера корреляционной зависимости между экспрессией KISS1 и KISS1R, MMP-2 и MMP-9 в материале эндометрия, эндометриальных гетеротопий и брюшины, использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмана (R).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты иммуногистохимического исследования

Исследование относительной площади экспрессии KISS1 показало: статистически достоверные различия (p<0,05) были выявлены при сравнении контрольной группы со II (p=0,00811) и III (p=0,03209) стадией наружного генитального эндометриоза (рисунок 1).

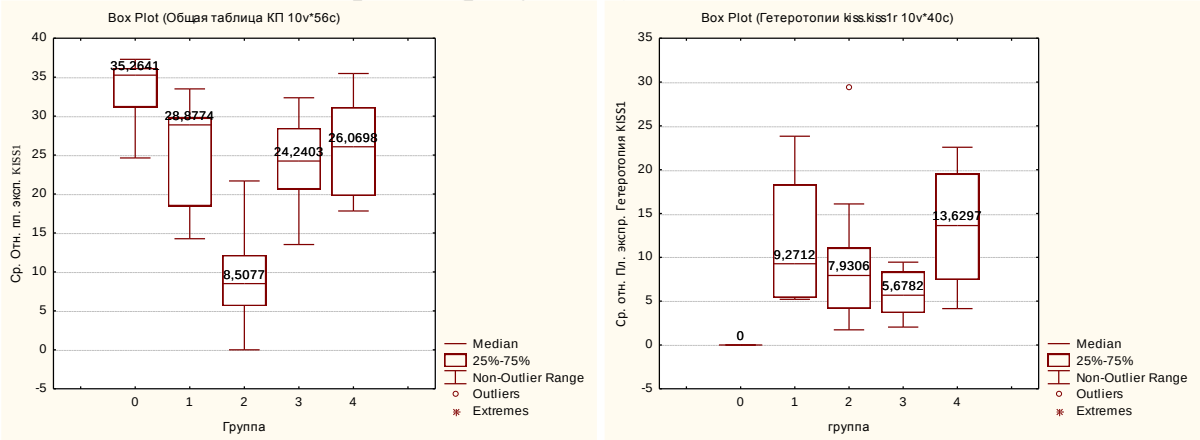

Рисунок 1 – Слева – диаграмма размахов относительной площади экспрессии KISS1 в эндометрии исследуемых групп; справа – диаграмма размахов относительной площади экспрессии KISS1 в эндометриальных гетеротопиях

В результате проведенной работы было показано, что в гетеротопиях присутствует белок кисспептин и его рецептор (рисунок 1, 2), в отличие от группы сравнения, где эти белки не экспрессировались. При этом максимальные значения исследуемого параметра относительной площади экспрессии были зафиксированы при IV стадии НГЭ. Полученные результаты могут свидетельствовать о роли кисспептина в определенных группах пациенток с НГЭ. Так же наличие кисспептина в эндометриальных гетеретопиях может говорить о том, что кисспептин, как белок предотвращающий метастазирование, может играть роль сдерживающего фактора.

Рисунок 2 – Слева – диаграмма размахов относительной площади экспрессии KISS1R в эндометрии исследуемых групп; справа – диаграмма размахов относительной площади экспрессии KISS1R в эндометриальных гетеротопиях.

Проведенное нами исследование рецептора к кисспептинам позволило установить статистически достоверное различие ($p<0,05$) при сравнении контроля с II ($p=0,00342$), III ($p=0,01997$) и IV стадией НГЭ ($p=0,02749$) (рисунок 2).

На микрофотографиях (рисунок 3) продемонстрированы результаты иммуногистохимического исследования. Экспрессия KISS1/KISS1R наблюдается в железистом компоненте эндометрия, в строме реакция к этим белкам не была выявлена. В гетеротопиях наблюдается реакция к белкам KISS1 и KISS1R в эктопических эндометриальных железах.

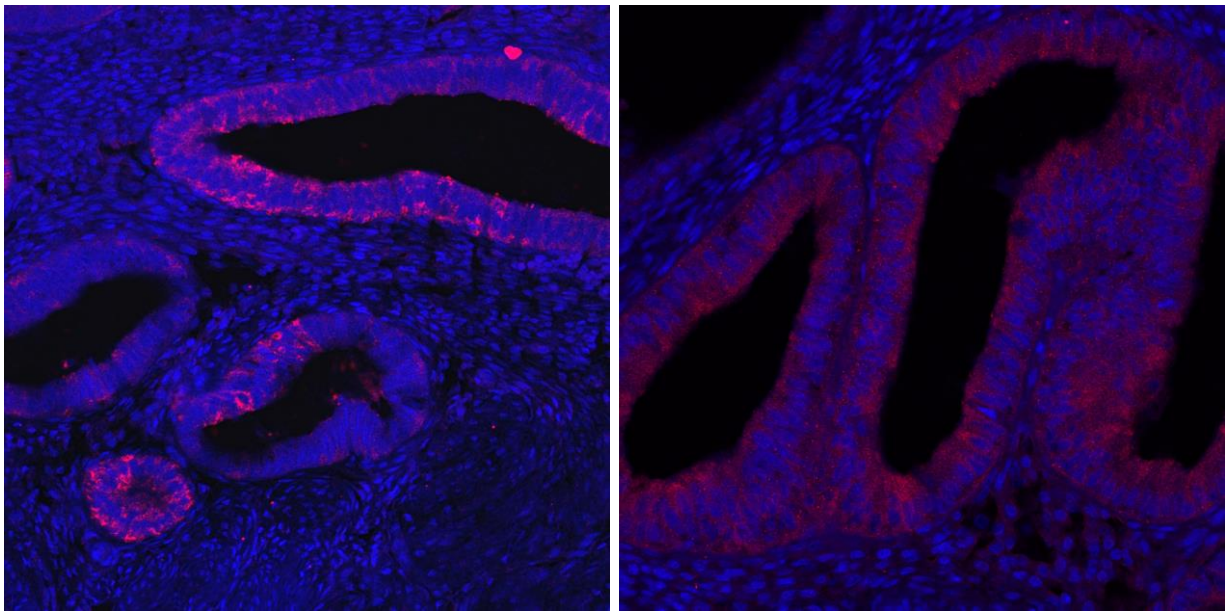

Рисунок 3 – Слева – KISS1 в эутопическом эндометрии контрольной группы; справа – в группе с НГЭ; ядра докрашены DAPI; увеличение ×10.

Показана прямая зависимость между экспрессией кисспептина и рецептора к кисспептину: при достоверно положительной экспрессии KISS1, была выявлена такая же экспрессия KISS1R. Сила корреляции равняется 0,76. Статистически

достоверная корреляция была выявлена при I и III стадии НГЭ и в контроле ($p<0,05$).

При исследовании ММР-2,-9 было принято решение разделять экспрессию в строме и железах и изучать их по отдельности, это связано с тем, что морфологически эти структуры различаются и экспрессируют разные половые гормоны на протяжении менструального цикла. В ходе проведенного эксперимента было установлено, что экспрессия ММР-2 в эндометриальных гетеротопиях имела тенденцию к повышению $S_{экс}$ на всех стадиях НГЭ. Считается, что ММР особенно важны на ранних стадиях развития эндометриоза. Любые изменения в равновесии между активностью ММР и их тканевыми ингибиторами могут способствовать развитию эндометриоза. Тенденция к повышению ММР-2 может говорить о более агрессивном течении болезни на тяжелых стадиях НГЭ.

При исследовании относительной площади экспрессии ММР-9 в железистом компоненте эндометрия было выявлено статистически достоверное увеличение ($p<0,05$) показателей по сравнению с контрольной группы на всех стадиях НГЭ ($p=0,0018$; $p=0,0027$; $p=0,0022$; $p=0,0032$ для I, II, III и IV стадии, соответственно). Так же было показано статистически достоверное увеличение относительной площади экспрессии ММР-9 в строме при НГЭ ($p<0,05$) в сравнении с контролем на всех стадиях НГЭ ($p=0,00342$; $p=0,00582$; $p=0,0031$; $p=0,0027$ для I, II, III и IV стадией, соответственно).

Хорошо известно, что KISS1 является регулятором ММР, он способен подавлять транскрипцию белков. Таким образом, можно предположить, что ММР меньше супрессируются при НГЭ, что в свою очередь приводит к активной миграции (инвазии клеток). На основании проведенных исследований представляется актуальным использование системы KISS1/KISS1R в качестве угнетающего комплекса для уменьшения экспрессии ММР, и создания тем самым условий, при которых инвазия эндометриальных клеток будет затруднена.

Антагонисты кисспептина могут быть использованы в терапии для лечения женщин в постменопаузе, при преждевременном половом созревании, синдроме поликистозных яичников, эндометриозе и миоме матки. Полное подавление ЛГ путем введения аналогов ГнРГ, может приводить к побочным эффектам, таким как повышение температуры, потеря либидо и снижение минеральной плотности костей (Ria R., 2002). Полное подавление гонадотропинов, эстрогенов и прогестеронов необходимо при раке простаты, для лечения эндометриоза частичное угнетение гормонов является более целесообразным. Клиническая эффективность в лечении эндометриоза и миомы матки с подавлением ГнРГ и использованием селективных модуляторов рецепторов прогестерона (Chabbert-Buffet N., 2005), позволяет предположить, что подходы, не основанные на полном подавлении оси ГнРГ, имеют четкое клиническое значение. Целенаправленное частичное подавление гонадотропина, обеспечиваемое с помощью кисспептина, имеет потенциал для преодоления существующих недостатков аналогов ГнРГ хотя появляющиеся данные об аналогах KISS1 демонстрируют его потенциал в полного подавления гормонов (Luo D., 2002).

Полученные данные согласуется с гипотезой о том, что более низкая экспрессия KISS1/KISS1R способствует патогенезу эндометриоза, повышая инвазию в ткани. В частности, снижение передачи сигналов KISS1 может ослабить подавление MMP-2 и MMP-9, тем самым позволяя увеличить деградацию внеклеточного матрикса. Это согласуется с исследованиями о том, что активность MMP-2 и MMP-9 повышена у женщин с эутопическим эндометрием по сравнению с эндометриозом. Считается, что повышенная активность MMP способствует патогенезу эндометриоза. Установлено, что в развитии эндометриоидных гетеротопий большую роль играют MMP. В нашем исследовании было показано, что в эктопическом эндометрии присутствуют KISS1, KISS1R, MMP-2 и MMP-9. Известно, что MMP-9 оказывает непосредственное влияние очаги эндометриоза через систему цитокинов и факторов роста на ангиогенез и спаечные процессы. Результаты работы позволили выявить увеличение относительной площади экспрессии MMP-2 в железистом компоненте эндометрия с НГЭ по сравнению с данным показателем в контрольном материале, что свидетельствует о повышении активности MMP-2 при патологии и согласуется с литературными данными об увеличении активности матриксинов при развитии НГЭ (Ozkan S., 2008; Tuttlies F., 2005). Более того, наблюдалась восходящая тенденция к изменению относительной площади экспрессии MMP-2 в железистом компоненте эндометрия в зависимости от стадии наружного генитального эндометриоза. С одной стороны, это может свидетельствовать об увеличении протеолитической активности MMP-2 при развитии патологии, и, как 51 следствие, о увеличении ретроградного заброса при повышении скорости отторжения эндометрия. В данном случае, увеличение экспрессии MMP-2 может быть проявлением молекулярных каскадов позитивной индукции, развивающихся при прогрессировании патологии. С другой стороны, нельзя исключать предполагаемой супрессорной активности MMP-2 в отношении ангиогенеза. В этом случае увеличение экспрессии MMP-2 могло бы явиться ответной реакцией, направленной на восстановление нормальной микрофлоры. По этой причине необходимо продолжить исследования для поиска сигнальных молекул, связанных с активностью MMP-2. Также следует учесть, что MMP-9 и MMP-2 могут участвовать в процессинге ряда молекул, которые могут оказывать существенное влияние на развитие и течение патологии. Полученные результаты по увеличению оптической плотности экспрессии MMP-2 в железистом компоненте эндометрия с наружным генитальным эндометриозом первой и четвертой стадий по сравнению с контролем свидетельствуют об увеличении активности данного белка при патологии, что сопоставимо с данными литературы (K.De Clercq, 2017).

Поскольку MMP-2 и MMP-9 могут расщеплять и инактивировать KISS1, повышенная активность MMP при эндометриозе может работать через обратную связь для снижения уровней KISS1, дополнительно снимая возможные ингибирующие эффекты KISS1 на миграцию и инвазию.

Результаты исследования эндометриальных клеточных культур

Морфология клеточных культур

Первичная клеточная культура эндометрия гетерогенна (рисунок 4) и содержит клетки с фибробластоподобной (eSF) и эпителиально-подобной морфологией (eEC). Через 24 ч культивирования клетки начали мигрировать из недиссоциированных конгломератов, образуя колонии небольших круглых клеток с эпителиоподобной морфологией. Были также клетки с типичной фибробластоподобной морфологией. Далее эти клетки с фибробластоподобной морфологией активно размножались и образовывали колоний, тогда как в эпителиоподобных колониях часть клеток погибала через 72 ч в культуре.

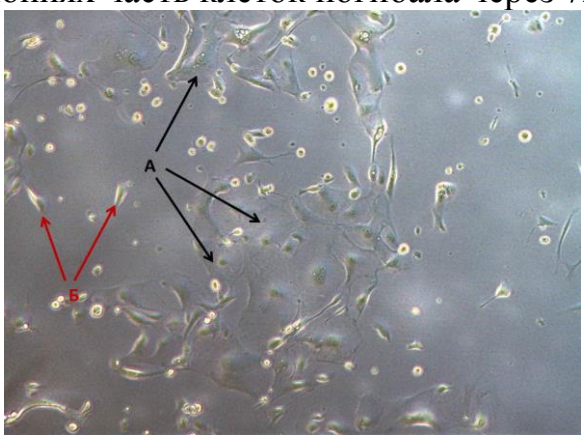

Рисунок 4 – Морфология клеток эндометрия: 24 ч в культуре; А – клетки с эпителиоподобной морфологией (eEC); Б – клетки с фибробластоподобной морфологией (eSF); прижизненная съемка, увеличение ×10.

По мере увеличения числа пассажей наблюдалось увеличение клеточной популяции с фибробластоподобной морфологией. К пятому пассажу клеточная популяция содержала только клетки с фибробластоподобной морфологией, они активно пролиферировали и за счет этого образовывался монослой. Клеточная культура эндометрия при длительном культивировании продемонстрировала способность объединяться в колонии и трехмерное образование сфероидов. Анализ колоний проводили на P5. Стоит отметить, что при высевании с высокой плотностью и длительном культивировании без расщепления все клеточные культуры демонстрируют тенденцию к образованию 3D-сфероидов.

Применение иммунофлюресцентного анализа позволило установить, что eEC экспрессируют E-кадгерин, мембранный белок эпителиального происхождения. Число железистых клеток варьировало от образца к образцу ($S_{экс.E\text{-}cadg}$=5,72-38,29%) и не являлось стабильным, что не позволяет использовать этот параметр, как ключевой для оценки числа железистых клеток в полученной культуре. В качестве маркера для eSF использовали Виментин (цитоскелетный маркер стромальных клеток). Сравнительная морфологическая оценка каждого пассажа четко верифицируют происходящие изменения: замещение большей части клеточной популяции на фибробластоподобную морфологию. Пролиферативный потенциал, стабильность клеток и способность к образованию 3D-сфероидов позволяют использовать клеточную культу как перспективный объект для изучения патологических процессов, ассоциированных с разрастанием

эндометрия, а именно, эндометриоз, аденомиоз, эндометриальная гиперплазия и эндометриальный рак.

Scratch-тест

Наиболее распространенной теорией возникновения эндометриоза является теория Сэмпсона, предполагающая адгезию и рост клеток эндометрия, попавших в брюшную полость посредством ретроградной менструации. В рамках проведенного диссертационного исследования изучалась подвижность клеток эндометрия с помощью Scratch-теста. Анализ полученных результатов позволил установить, что клеточные линии принципиально различаются между собой по миграционной способности. В контрольных образцах клеточных культур через 24 часа площадь «раны» составляла 27,29±2,61% от площади препарата, через 48 часа – 17,61±1,63%. В культуре от пациенток с НГЭ площадь раны через 24 часа составляла 20,77±2,59%, через 48 часа – 8,21±1,94% (рисунок 5). Проведенный статистический анализ позволил установить статистически достоверные различия ($p<0,05$), что возможно связано со способностью кисспептина ингибировать миграцию клеток. Через 72 ч наблюдалось полное закрытие «раны» в группе НГЭ, и 10,59±0,52 в контрольной группе. Исходя из ширины раны, мы рассчитали расстояние миграции и скорость движения клеток, которая, в среднем, равна 36,53 мкм/ч.

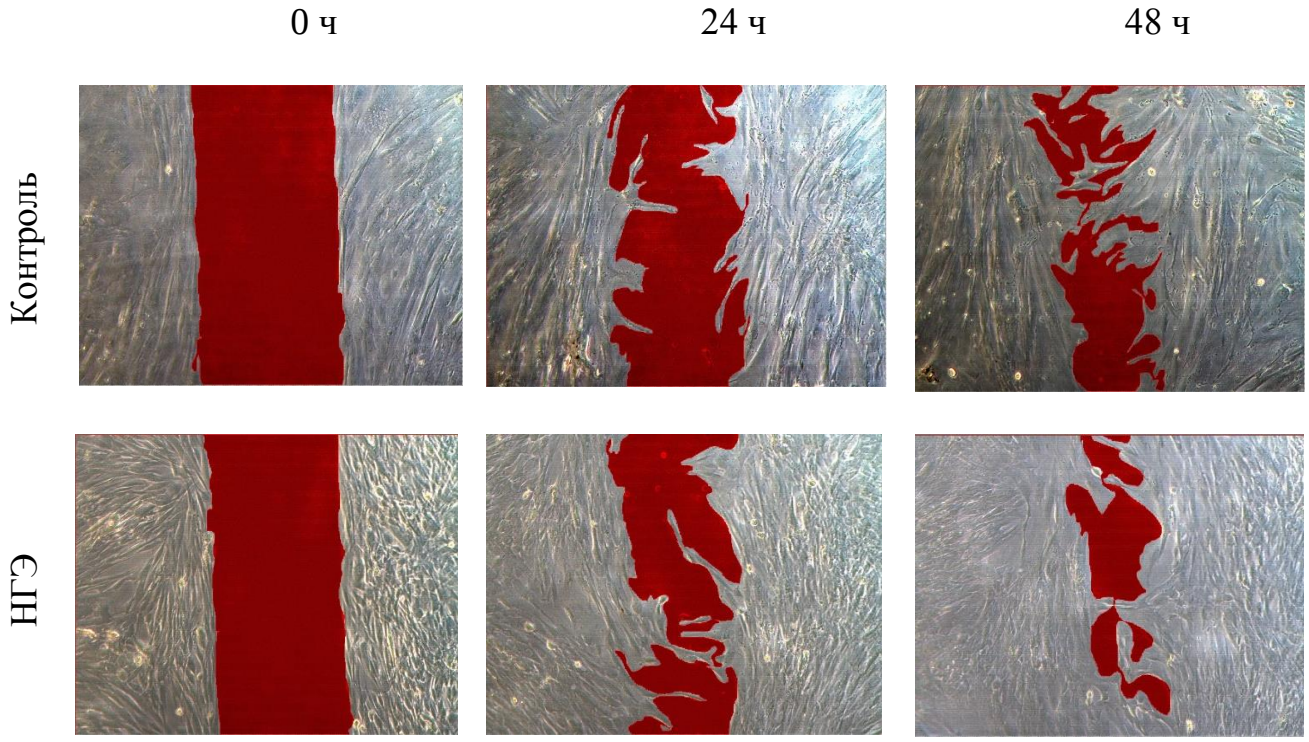

Рисунок 5 – Тест на зарастание «раны» – Scratch-тест, красным цветом выделена площадь раны, увеличение ×40.

Инвазия клеточной культуры эндометрия

Изучение миграции клеток в исследования, посвященных изучению эндометриоза, представляет особый интерес, поскольку одной из основных проблем НГЭ является образование эндометриоидных гетеротопий.

В ходе данного исследования 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 ×400). В клеточных культурах, полученных от пациенток с эндометриозом, достоверные различия не были выявлены и составили 6,5-12,8 клеток в поле зрения (рисунок 6). В ходе исследования добавление перитонеальной жидкости в нижнюю камеру не влияло на миграционные способности клеток контрольной группы, однако усиливало инвазию в опытной группе. Полученные данные объясняются повышением в перитонеальной жидкости пациенток с НГЭ числа цитокинов, активирующих ангиогенез (ИЛ1β, ИЛ6 и ИЛ8) и стимулирующих адгезию клеток эндометрия к мезотелию брюшины (ФНОα), а также факторов роста сосудов (VEGF), усиливающих инвазивные свойства клеток в культуре.

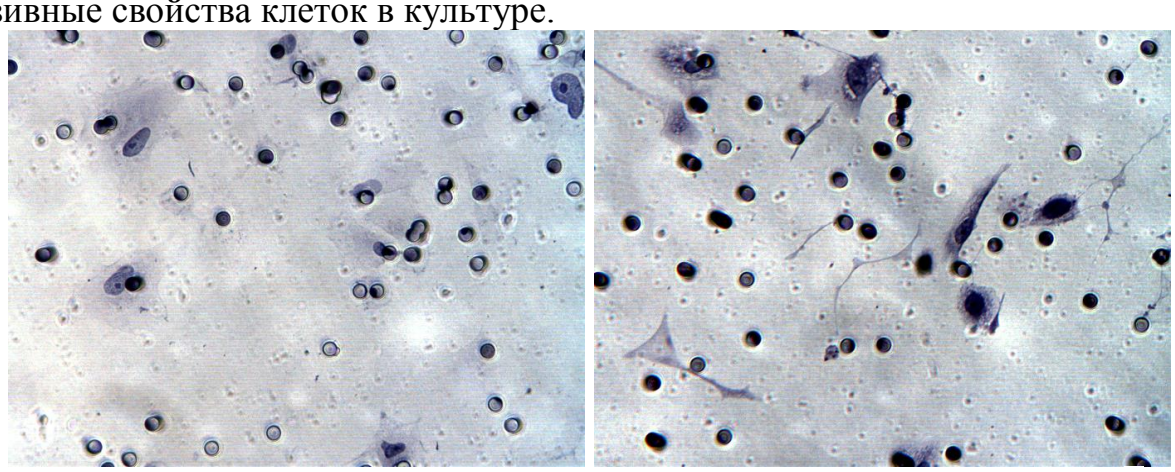

Рисунок 6 – Анализ миграционных свойств клеточных культур эндометрия. Слева – контрольная клеточная культура эндометрия. Справа – Клеточная культура эндометрия от пациенток с наружным генитальным эндометриозом; увеличение ×40.

Иммуноцитохимический анализ KISS1/KISS1R в клеточной культуре эндометрия

Было установлено, что кисспептин и его рецептор присутствуют в первичной клеточной культуре эндометрия в единичных клетках. Проведенное исследование позволило установить, что относительная площадь экспрессии кисспептина имела тенденции к уменьшению уровня исследуемого белка при НГЭ (рисунок 7). Самые низкие показатели были зарегистрированы при НГЭ IV степени ($S_{экс KISS1}$=0,568). Выявленные различия не являются статистически достоверными, что связано с недостаточной выборкой. Уровень экспрессии рецептора к кисспептину в ходе проведенного исследования не изменился. Было установлено, что в клеточной культуре от доноров с НГЭ уровень KISS1был снижен, миграционная активность этой линии была статистически достоверно повышена по сравнению с контролем. Однако 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.

Иммуноцитохимический анализ ММР-2,-9 в клеточной культуре эндометрия

В ходе данного исследования было показано, что ММР-2,-9 присутствуют в первичной клеточной культуре эндометрия в единичных клетках. Анализ экспрессии ММР-2,-9 в культуре показал, что статистических различий между контролем и исследуемой группой выявлено не было ($p>0,05$). Был установлен резкий скачок матриксной металлопротеиназы 9 типа только в клеточной культуре от одной пациентки с НГЭ, тогда как у других пациенток из этой группы таких изменений уровня экспрессии ММР -9 нами не зарегистрировано.

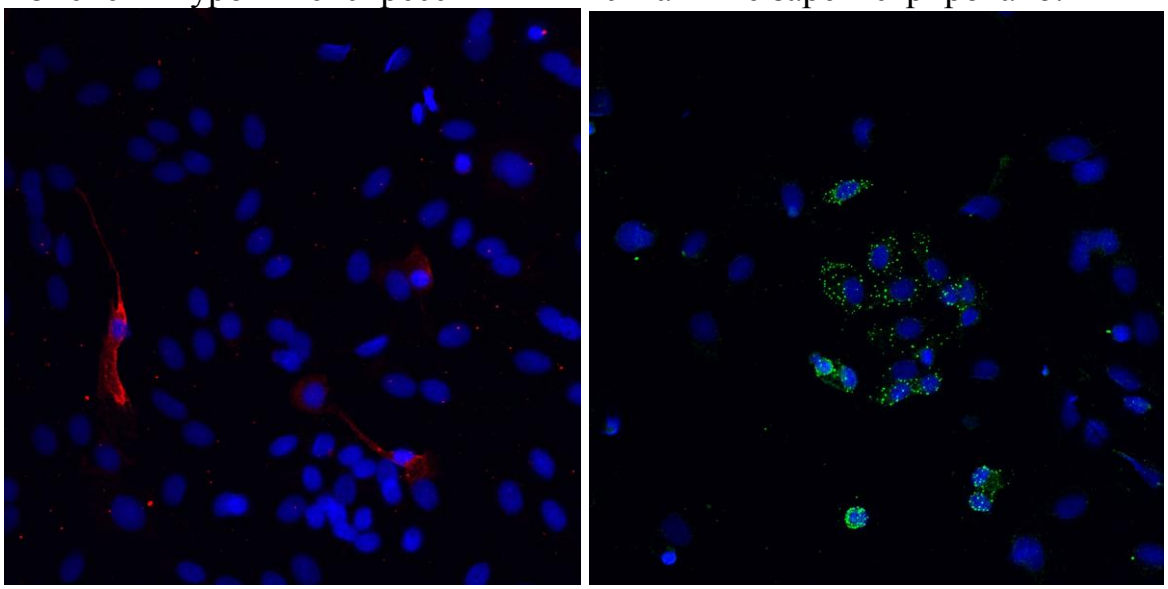

Рисунок 7 – А – экспрессия KISS1 в клеточной культуре эндометрия в группе контроля; KISS1 – красная флуоресценция (Alexa Flour 647); Б – экспрессия ММР-2 в клеточной культуре эндометрия при НГЭ; ММР-2 – зеленая флуоресценция (Alexa Flour 488); ядра докрашены DAPI; увеличение ×40.

Резюмируя результаты исследования эндометриальных клеточных культур, отметим, что в культурах присутствуют белки KISS1, KISS1R, ММР-2 и ММР-9. Кисспептин и его рецептор показали статистически не различимые уровни экспрессии, как в контроле, так и в эутопическом эндометрии. Анализ экспрессии ММР-2,-9 в культуре показал, что статистических различий между контролем и исследуемой группой выявлено не было, возможно это связано с небольшой выборкой.

ВЫВОДЫ

1. Усовершенствован ферментативный способ получения эндометриальной клеточной линии. Впервые было показано, что первичная клеточная культура эндометрия, полученная от пациенток с НГЭ, является гетерогенной и содержит 2 фракции клеток: eSF и eEC. По мере увеличения числа пассажей наблюдалось замещение большей части

клеточной популяции на фибробластоподобную морфологию. Клеточная культура эндометрия при длительном культивировании продемонстрировала способность объединяться в колонии и трехмерное образование сфероидов.

2. В эндометриальной клеточной линии были выявлены белки KISS1, KISS1R, MMP-2, MMP-9. В клеточной культуре от доноров с НГЭ уровень KISS1был снижен, миграционная активность этой линии была статистически достоверно повышена по сравнению с контролем. Было продемонстрировано, что KISS1/KISS1R экспрессируются еЕС.
3. Корреляционный анализ выявил статистически достоверную положительную корреляцию между KISS1 и KISS1R (Spearman R = 0,7567). Статистически достоверная отрицательная связь умеренной тесноты была обнаружена между показателями относительной площади экспрессии MMP-9 и MMP-2 в железистом компоненте эндометрия пациенток с НГЭ-II (Spearman R = -0,53). Корреляционный анализ установил положительную связь умеренной тесноты между MMP-9 и MMP-2 в эндометриальных гетеротопиях пациенток с НГЭ-II (Spearman R = 0,57).
4. Проведенное исследование позволило установить, что в эктопическом эндометрии присутствует система KISS1/KISS1R, в отличие от группы сравнения, где эти белки не экспрессировались. При сравнении относительной площади экспрессии KISS1 в эутопическом эндометрии было выявлено следующее: уменьшение показателя на II (p=0,00811) и III (p=0,03209) стадии НГЭ; уменьшение уровня KISS1R на II (p=0,00342), III (p=0,01997) и IV стадии НГЭ (p=0,02749).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Клейменова, Т.С. Исследование экспрессии рецептора к белку кисспептину GPR45 (KISS1R) при наружном генитальном эндометриозе/ Т.С. Клейменова, А.О. Дурнова // Материалы научно-практической конференции. — 2014. — №2. — С. 189−191.
2. Клейменова, Т.С. Оценка комплекса KISS1/KISS1R в культуре эндометриальных клеток при эндометриозе/ Т.С. Клейменова, А.О. Дурнова, М.Н. Судалина, В.О. Полякова // 100 лет Оттовской морфологии: от рутинной гистологии к молекулярной микроскопии. — 2014. — С. 20−21.
3. Клейменова, Т.С. Верификация рецептора к кисспептинам в клеточных культурах эндометрия при эндометриозе/ Т.С. Клейменова, А.О. Дурнова// Трансляциооная медицина: от теории к практике. — 2014. — №2 — С. 177−178.
4. Клейменова, Т.С. Культура эндометриальных клеток, полученных от больных эндометриозом/ Т.С. Клейменова, А.О. Дурнова// Научный форум с международным участием «Неделя науки СПбПУ». — 2014. — С. 424−426.
5. Клейменова, Т.С. Характеристика эндометриальных эпителиальных и стромальных клеток в культуре в норме и при эндометриозе/ Т.С. Клейменова, А.О. Дурнова, М.Н. Судалина// Материалы VI ежегодной

научной конференции молодых ученых и специалистов «Репродуктивная медицина: взгляд молодых-2015» . — 2015. — С. 23−25.

6. Дурнова, А.О. Динамика состояния эндометриальной культуры полученной от пациенток с наружным генитальным эндометриозом/ А.О. Дурнова, С. Клейменова, М.Н. Судалина// Материалы VI ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов «Репродуктивная медицина: взгляд молодых-2015». — 2015. — С. 51−53.
7. Клейменова, Т.С. Характеристика эндометриальных клеток в культуре в норме и при эндометриозе/ Т.С. Клейменова, А.О. Дробинцева// Международная научная конференция научного парка СПГБУ трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину. — 2015. — С. 48−50.
8. Клейменова, Т.С. Исследование белка кисспептина в эндометрии человека при эндометриозе/ Т.С. Клейменова, А.О. Дробинцева// Журнал акушерства и женских болезней. — 2016. — №65 — С. 39−40.
9. Kleimenova, T. Identification of kisspeptin in endometrial cell culture from patients with endometriosis and ex vivo/ T. Kleimenova, A. Drobintseva, V. Polykova, I. Kvetnoy// Gynecological Endocrinology. — 2016. — P. 62.
10. Клейменова, Т.С. Получение культуры эндометриальных клеток от пациенток с наружным генитальным эндометриозом/ Т.С. Клейменова// Фундаментальные и прикладные исследования в современном мире. — 2016. — Т. 15, № 1. — С. 39−40.
11. **Дробинцева, А.О. Экспрессия кисспептина и его рецептора при наружном генитальном эндометриозе/ А.О. Дробинцева, Т.С. Клейменова, В.О. Полякова// Молекулярная медицина. — 2016. — Т. 14, № 5. — С. 55−59.**
12. Клейменова, Т.С. Экспрессия кисспептина и его рецептора в эндометриальных гетеротопиях/ Т.С. Клейменова, А.О. Дробинцева, В.О. Полякова// XI Международный конгресс по репродуктивной медицине. — 2017. — С. 40−41.
13. Drobintseva, A. Verification of kisspeptins and their receptors in fetal hypothalamus-pituitary-gonad axis/ A. Drobintseva, V. Bolotskikh, V. Rodichkina, T. Kleimenova, V. Polykova// The international Academy of Human Reproduction. — 2017. — С. 52−53.
14. Клейменова, Т.С. Экспрессия кисспептина в эндометрии на разных стадиях эндометриоза/ Т.С. Клейменова, А.О. Дробинцева// Журнал акушерства и женских болезней. — 2017. — Т. 66, № спецвыпуск. — С. 114−115.
15. **Родичкина, В.Р. Иммуногистохимическая верификация кисспептинов и их рецептора в органах плода человека в период внутриутробного развития/ В.Р. Родичкина, Т.С. Клейменова, А.О. Дробинцева, В.О. Полякова, Р.П. Костюченко, И.М. Кветной// Онтогенез. — 2017. — Т. 48, № 3. — С. 203−210.**
16. **Айламазян, Э.К. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. верификация экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона в течение**

менструального цикла/ Э.К. Айламазян, Г.Х. Толибова, Т.Г. Траль, М.А. Петросян, Т.С. Клейменова, И.Ю. Коган, В.О. Полякова, И.М. Кветной// Молекулярная медицина. — 2017. — Т. 15, № 3. — С. 27−31.

17. **Кветной, И.М. Экспрессия сигнальных молекул в эндометрии человека: оптимизация имплантационной восприимчивости под действием аллогенного гидролизата плаценты/ И.М. Кветной, Т.С. Клейменова, В.Р. Родичкина, А.О. Дробинцева, В.О. Полякова, А.А. Цыпурдеева, М.Р. Оразов, С.Р. Поликарпова// Молекулярная медицина. — 2018. — Т. 16, № 1. — С. 37−43.**
18. Kleimenova, T. Identification of kisspeptin and matrix metalloproteinases in endometrial cell culture from patients with endometriosis/ T. Kleimenova, A. Drobintseva, V. Polyakova, V. Rodichkina// Gynecological Endocrinology. — 2018. — P. 265.
19. Клейменова, Т.С. Исследование миграционных и инвазивных свойств клеточной культуры, полученной от пациенток с эндометриозом/ Т.С. Клейменова, А.О. Дробинцева// Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье. — 2018. — С. 185−187.
20. Дробинцева, А.О. Конфокальная лазерная микроскопия: визуализация кисспептинов в перинатальном периоде развития человека/ А.О. Дробинцева, В.О. Полякова, Ю.С. Крылова, В.Р. Родичкина, Т.С. Клейменова, Н.А. Сидорова, И.М. Кветной// Детская медицина Северо-Запада. — 2018. — Т. 7, № 1. — С. 375−376.
21. Петросян, М.А. Эндометриальная клеточная линия: получение, культивирование и характеристика: методические рекомендации/ М.А. Петросян, Т.С. Горячая, Н.О. Мележникова, Т.С. Клейменова. — СПб. : Эко-Вектор, 2018. — 44 с.
22. Клейменова, Т.С. Исследование матриксных металлопротеиназ-2,-9 и анализ инвазии клеток в культуре эндометрия, полученных от пациенток с эндометриозом/ Т.С. Клейменова, А.О. Дробинцева// Репродуктивная медицина: взгляд молодых. — 2018. — С. 73−75.
23. Лисова, А.Е. Оценка способности эндометриальных клеточных линий к децидуальной дифференцировке/ А.Е. Лисова, Н.О. Мележникова, Т.С. Клейменова, А.П. Домнина// Журнал акушерства и женских болезней. — 2019. — Т. 68, № S. — С. 30−31.
24. Клейменова, Т.С. Эндометриальная культура человека: инвазионные свойства/ Т.С. Клейменова, А.О. Дробинцева, В.О. Полякова, Ю.С. Крылова, А.А. Цыпурдеева// Журнал репродуктивная медицина. — 2019. — Т. 1, № 38. — С. 19−24.
25. Клейменова, Т.С. Возможное влияние кисспептинов на развитие эндометриоидных гетеротопий/ Т.С. Клейменова, А.О. Дробинцева, В.О. Полякова// Патологическая анатомия: традиционная современность. — 2019. — С. 67−69.
26. Клейменова, Т.С. Экспрессия кисспептина и матриксных металлопротеиназ в культуре эндометрия человека: исследование инвазивных и миграционных свойств/ Т.С. Клейменова, А.О. Дробинцева, В.О. Полякова, А.А.

Цыпурдеева// Журнал акушерства и женских болезней. — 2019. — Т. 68, № 2. — С. 43−50.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

KISS1 – кисспептины
KISS1R (GPR54) – рецептор к кисспептинам
MMP-2 – матриксная металлопротеиназа 2-ого типа
MMP-9 – матриксная металлопротеиназа 9-ого типа
ГнРГ – гонадотропин-рилизинг-гормон
ИГХ – иммуногистохимическое исследование
ИЛ1β – интерлейкин 1β
ИЛ6 – интерлейкин 6
ИЛ8 – интерлейкин 8
НГЭ – наружный генитальный эндометриоз
ЛГ – Лютеинизирующий гормон
ФНОα – фактор некроза опухоли альфа
VEGF – фактор роста эндотелия сосудов
eEC – эпителиальные клетки эндометрия
eSF – стромальные клетки эндометрия